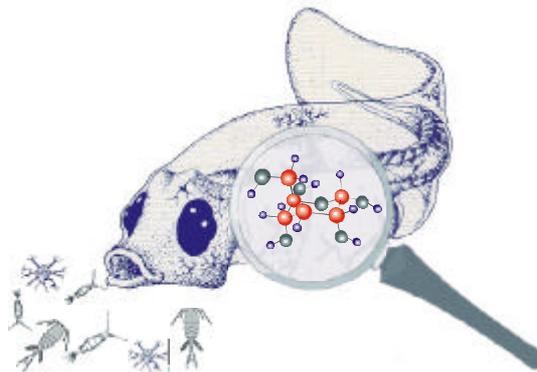


**AUS DEM ZENTRUM FÜR MEERES- UND KLIMAFORSCHUNG DER
UNIVERSITÄT HAMBURG**

Die Trypsinaktivität als biochemischer Indikator zur Bestimmung des Ernährungszustandes sowie der Fressaktivität von Fischlarven und seine Anwendung in Feldstudien

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg



vorgelegt von

Bernd Ueberschär

aus Wieda im Südharz

**INSTITUT FÜR HYDROBIOLOGIE UND FISCHEREIWISSENSCHAFT
Hamburg 1999**

1. Einleitung	4
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Biochemische Analytik	17
2.1.1 Chemikalien	17
2.1.2 Präparation der Fischlarven	18
2.1.3 Fluoreszenzphotometrische Messung der Enzymaktivitäten.....	20
2.1.4 Eichung, Linearität und Proportionalität der Enzymaktivitätsbestimmung	23
2.1.5 Quantifizierung der Trypsinaktivität	29
2.1.6 Verluste von Enzymaktivität im Larvenhomogenat	30
2.1.7 Einfluss der Zentrifugationsgeschwindigkeit	30
2.1.8 Enzymkinetik: Substratkonzentration und Substrataffinität,.....	32
2.1.9 Temperatur-, pH-Optimum und Temperaturreistenz	33
2.1.10 Interkalibrierung.....	34
2.1.11 Faktorberechnung	34
2.1.12 Methodenoptimierung	35
2.2 Laborexperimente mit Fischlarven	36
2.2.1. Auswahl der Fischarten	36
2.2.2 Laboraufzucht, Gametengewinnung, Inkubation und Aufzucht	37
2.2.2.1 Hering (<i>Clupea harengus</i> L.)	37
2.2.2.2 Steinbutt (<i>Scophthalmus maximus</i> L.)	47
2.2.2.3 Dorsch (<i>Gadus morhua</i> L.)	51
2.2.2.3 Wolfsbarsch (<i>Dicentrachus labrax</i> L.)	54
2.2.2.4 Goldbrasse (<i>Sparus aurata</i> L.)	57
2.2.2.5 Brasilianische Sardine (<i>Sardinella brasiliensis</i> Steindachner 1879)	60
2.3 Fischlarven aus Feldproben.....	64
2.3.1 Heringslarven (<i>Clupea harengus</i> L.).....	64
2.3.2 Sprotten (<i>Sprattus sprattus</i> L.).....	66
2.3.3 Sardinen (<i>Sardina pilchardus</i> Walbaum 1792)	67
2.3.4 Dorsch (<i>Gadus morhua</i> L.)	67
2.3.5 Brasilianische Sardine (<i>Sardinella brasiliensis</i> Steindachner 1879)	68
2.3.6 Schellfisch (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>)	68
2.3.7 Bezugsgrößen für die Trypsinaktivität.....	68
3 Ergebnisse	70
3.1 Biochemische Analytik	70
3.1.1 Verluste von Enzymaktivität im Larvenhomogenat	70
3.1.2 Enzymkinetik: Substratkonzentration und Substrataffinität.....	72
3.1.3 Temperatur-, pH-Optimum und Temperaturreistenz	74
3.1.4 Interkalibrierung.....	76

3.1.5 Faktorberechnung	79
3.1.6 Methodenoptimierung	83
3.2 Trypsinaktivitätsbestimmung - Laborexperimente	87
3.2.1 Vergleich verschiedener Ernährungsbedingungen.....	87
3.2.1.1 Hering (<i>Clupea harengus</i> L.)	88
3.2.1.2 Steinbutt (<i>Scophthalmus maximus</i> L.)	94
3.2.1.3 Dorsch (<i>Gadus morhua</i> L.)	101
3.2.1.4 Wolfsbarsch (<i>Dicentrachus labrax</i> L.)	103
3.2.1.5 Goldbrassen (<i>Sparus aurata</i> L.)	105
3.2.1.6 Brasilianische Sardine (<i>Sardinella brasiliensis</i> Steindachner 1879)	108
3.2.2 Tagesrhythmik der Trypsinaktivität.....	111
3.2.2.1 Hering (<i>Clupea harengus</i> L.)	111
3.2.2.2 Steinbutt (<i>Scophthalmus maximus</i> L.)	114
3.2.2.3 Dorsch (<i>Gadus morhua</i> L.)	117
3.3 Trypsinaktivitätsbestimmung - Feldproben.....	119
3.3.1 Hering (<i>Clupea harengus</i> L.)	119
3.3.2 Dorsch (<i>Gadus morhua</i> L.)	125
3.3.3 Sprotte (<i>Sprattus sprattus</i> L.)	125
3.3.4 Brasilianische Sardine (<i>Sardinella brasiliensis</i> Steindachner 1879)	129
3.3.5 Schellfisch (<i>Melanogrammus aeglefinus</i> L.)	130
3.3.6 Tagesrhythmik der Trypsinaktivität in Feldproben.....	131
3.3.6.1 Sprotte (<i>Sprattus sprattus</i> L.)	131
3.3.6.2 Sardine (<i>Sardina pilchardus</i> Walbaum 1792)	133
4 Diskussion.....	136
4.1 Biochemische Analytik und methodische Aspekte	137
4.2 Trypsinaktivitätsbestimmung - Laborexperimente	145
4.3 Trypsinaktivitätsbestimmung - Feldanwendungen	159
4.4 Schlussbetrachtung.....	167
5. Zusammenfassung	170
6 Literaturverzeichnis.....	174
7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	187
Danksagungen	201

1. Einleitung

In der zweiten Hälfte dieses Jahrhunderts war die weltweite Fischerei einem enormen Wandel unterworfen. Seit 1950 bis 1989 haben sich die Gesamtanlandungen von Fisch von 18 Millionen Tonnen auf jährlich etwa 85 Millionen Tonnen fast verfünffacht. Im wesentlichen ist diese Steigerung auf neue Technologien in der Fischerei und Fortschritte im Wissen um die Aufenthaltsorte nutzbarer Fischbestände zurückzuführen. So ist es heute technisch möglich, Bestände von schwarmbildenden Fischen, wie beispielsweise die Heringschwärme, in überschaubaren marinen Lebensräumen wie etwa die Nordsee, quantitativ zu eliminieren. Was sich lange Zeit unter natürlichen Verhältnissen durchaus als Vorteil erwiesen hat, z.B. die Schwarmbildung von Fischen (Kils 1986), kann nun in kurzer Zeit unter der Einwirkung des "Räubers Mensch" zur Gefährdung der Art führen.

Seit 1989 stagnieren die Anlandungen aus der weltweiten Fischerei bei etwa 85 Millionen Tonnen (FAO 1994). Galten noch 1980 nur 20 der kommerziell genutzten Fischarten als übernutzt, so sind es heute weltweit bereits mehr als 80 Arten die als überfischt gelten können. Aus diesen Zahlen wird deutlich, dass sich die Gesamtjahreserträge nur durch die Hinwendung von einem überfischten und ausgebeuteten Bestand zu neuen Ressourcen auf dem zur Zeit aktuellen Niveau halten lassen. Diese Strategie birgt jedoch potentielle Gefahren. Ein Beispiel ist Fischerei auf den Granatbarsch (*Hoplostetus atlanticus*), eine in Aggregationen an unterseeischen Erhebungen in über 800m Tiefe lebende Fischart, die erst seit Anfang der 80er Jahre mit Hilfe neuer Techniken intensiv befischt wird (Koslow 1996). Diese Fischart soll sehr wohlschmeckend sein, findet grosse Akzeptanz beim Verbraucher und erzielt einen hohen Preis. Das besondere am Granatbarsch ist sein hohes Lebensalter, diese Art kann, soweit bekannt, über 100 Jahre alt werden, wächst sehr langsam und wird erst im Alter von etwa 30 Jahren geschlechtsreif. Diese biologischen Eigenschaften machen diese Art extrem anfällig gegen zu hohen Fischereidruck. So gilt die Art schon als überfischt bevor ihre Biologie für ein geeignetes Management ausreichend erforscht ist. Gegenwärtige Erträge von über 5200 Tonnen jährlich aus den Gewässern vor Neuseeland und Südostaustralien liegen schon weit über der angenommenen Grenze des dauerhaft möglichen Ertrages, der bei etwa 3000 Tonnen liegen soll.

Ein andere Strategie der gegenwärtig betriebenen Fischerei liegt in der Hinwendung zu Fischbeständen, die auf einer niedrigen Trophiestufe einzuordnen sind und nicht mehr für den direkten menschlichen Verzehr gefangen werden. In den letzten 45 Jahren hat sich die Fischerei global mangels genügender Biomasse mehr und mehr von grossen, sich piscivor ernährenden Fischen hin zu kleineren, sich vorwiegend planktivor ernährenden Fischen verlagert. Dieser massive Eingriff in die marine Nahrungspyramide auf niedrigem Niveau kann langfristig die natürlichen Strukturen mariner Nahrungsketten verändern. Beispiele dafür sind die sog. "Gammelfischerei" auf Sandaale (*Ammodytidae*) oder Stintdorsche (*Trisopterus esmarkii*) in der Nordsee und im Nordostatlantik. Diese Arten sind eine wichtige

Nahrungsgrundlage beispielsweise für den Kabeljau. Massenhaftes Abfischen entzieht einerseits den piscivoren Fischen die Nahrungsgrundlage. Andererseits sind die Stintdorsche Hauptkonsumenten der Euphausiaceen, während diese wiederum Hauptkonsumenten des Zooplanktons sind, welches die Nahrungsgrundlage für kommerziell wichtige Fischarten wie beispielsweise den Heringen bildet. Einige Invertebraten wie Euphausiaceen wiederum gelten als ernstzunehmende Fischlarvenräuber (van der Veer & Bergmann 1987, Theilacker et al. 1993, Bailey et al. 1993, Witting & Able 1995). So entsteht ein kaskadenartiger Effekt, der letztendlich zu einem hohen Bestand nicht nutzbarer Euphausiaceen führen kann (Pauly et al. 1998). Viele Invertebraten sind bedeutende Räuber von Fischeiern- und Larven aber andererseits wiederum wichtige Beutetiere für die juvenilen und adulten derselben Arten. Die Erhaltung der Balance zwischen dieser Räuber-Beute- Beziehung ist daher wichtig für die Gesamterhaltung der betroffenen Arten.

Auch in Zeiten, in denen der menschliche Eingriff in das natürliche Geschehen im Meer noch keine so umfassende und beherrschende Wirkung hatte wie heute, gab es schon grosse Schwankungen bei der Rekrutierung der grossen Nutzfischbestände. Hjort (1914, 1926) war einer der ersten, der diese Rekrutierungsschwankungen mit der Nahrungssituation für die heranwachsenden Fischlarven in Verbindung brachte. Bekannte Beispiele für vom Menschen unbeeinflusste, dramatische Änderungen im Rekrutierungserfolg die sich in den Fischereierträgen widerspiegelten, sind die positive Entwicklung des Bestandes der Japanischen Sardine (*Sardinops melanostica*) zwischen 1920 und 1992 oder die negative Entwicklung im Bestand einer Sardellenart (*Engraulis ringens*) in den 60er und 70er Jahren in einem grossen Auftriebsgebiet vor der Küste Perus. In beiden Fällen waren die Nahrungsbedingungen für die jüngsten Larvenstadien besonders gut bzw. besonders schlecht, was jeweils zu den drastischen Änderungen im Rekrutierungserfolg führte. Beide Beispiele zeigen, dass räumlich grossskalige, aber zeitlich kleinskalige Veränderungen in der Hydrographie eines Gebietes in kurzer Zeit zu dramatischen Änderungen im Fischereiertrag führen können.

Die bisherigen Ausführungen machen deutlich, dass es sowohl einen anthropogenen Einfluss, z.B. in Form des Fischereidrucks als auch natürliche Effekte auf die Entwicklung der Fischbestandsgrösse gibt. Wenn beide Einflussgrössen in dieselbe ungünstige Richtung wirken, kann es zu kritischen Zuständen für einen Fischbestand kommen. Häufig sind physikalische Ereignisse und deren Folgen für den Rekrutierungserfolg einer Art nicht immer so klar zu erkennen wie in den obigen Beispielen. Der eher schleichende Zusammenbruch des Heringsbestandes in der Nordsee in den 70er Jahren und der neuerliche Zusammenbruch seit 1994 sind nicht primär Folge einer Überfischung sondern eher durch eine Veränderung der hydrographischen Situation bedingt (Cushing 1984). Werden solche Trends nicht rechtzeitig erkannt, kann die Fortsetzung der Fischerei auf dem Niveau hoher Erträge dramatische Folgen haben. Die Heringsfänge von 1996 waren die niedrigsten seit 1981, und die Biomasse der Laichfischbestände wird jenseits des sicheren biologischen Limits vermutet.

Diese Situation weist viele Parallelen mit jener Situation in den 60er und 70er Jahren auf (ICES Working Group Report, 1997).

Die Praxis, Fangquoten auf der Feststellung vorhandener Bestände oder mit Hilfe von Ei- und Larvenzählungen zu kalkulieren, berücksichtigt nicht die Überlebenschancen der Larvengeneration einer Art. Die Überlebensraten der Fische im Larvenstadium werden aber als ein entscheidender Faktor für den Erhalt und Zuwachs einer Art betrachtet (Hjort 1914, 1926, May 1974, Rothschild 1986, Bailey & Houde 1989). Die zukünftige Jahrgangsstärke muss dabei nicht zwangsläufig mit den Mortalitätsraten der Larven im Stadium der Umstellung von interner auf externe Nahrung korreliert sein, wie von Hjort als "critical period concept" (1914) postuliert wurde. Untersuchungen beispielsweise bei der japanischen Sardine (*Sardinops melanosticus*), einer Sardellenart (*Engraulis mordax*) oder bei der pazifischen Sardine (*Sardinops sagax*) haben keine Zusammenhänge zwischen der Abundanz der jeweiligen Larven nach der Dottersackphase und den ein- bzw. zweijährigen Rekruten festgestellt. Es wurde angenommen, dass eher eine kumulative Sterblichkeit während der gesamten larvalen und auch noch in der juvenilen Phase für das Rekrutierungsergebnis verantwortlich war (Peterman et al. 1988, Butler 1991, Watanabe et al. 1996).

Es lag daher nahe, die Ursachen für die Larvensterblichkeiten einer genaueren Betrachtung zu unterziehen. Cushing (1975) nahm dazu die Gedanken von Hjort (1914) auf und erweiterte das "critical period concept" zur sogenannten "match-mismatch"-Theorie, die räumliches und zeitliches Zusammentreffen von larvalem Schlupf und hohe Nährtierdichte für einen Rekrutierungserfolg voraussetzt, aber lediglich die Phase der frühen Nahrungsaufnahme als kritische, die Rekrutierung bestimmende Larvenperiode beschreibt. In der larvalen Phase wechseln Fische mehrfach das Grössenspektrum der Nahrung, diese jeweilige Anpassung an andere Nahrungsorganismen kann als Stress verstanden werden und kritische Phasen verursachen, in denen die Mortalitätsraten gerade auch älterer Larven signifikant erhöht sein können. Es gibt Vermutungen, dass das Verhungern eine ständige Bedrohung für Fischlarven aller Altersklassen darstellt und eine ausreichende Versorgung mit Nahrung geeigneter Qualität und in der richtigen Grössenordnung in Phasen schnellen Larvenwachstums dieselbe Bedeutung für das Überleben hat wie die zeitliche Synchronisation und ausreichende Versorgung mit Nauplien nach der Dottersackphase als Erstfutter (Ellertsen et al. 1981, Theilacker 1986). Houde (1989b) erwähnt, dass die hohe Fruchtbarkeit von Fischen durchaus hohe Verluste von Eiern und frühen Larvenstadien ohne besondere Konsequenzen für die Rekrutierung gestattet, während kritische Zustände in der Vitalität der Larven durch ein unzureichendes Futterangebot im fortgeschrittenen Alter jedoch drastische Folgen für die Rekrutierung haben kann.

Andere Untersuchungen betonen den Räuberdruck als wesentliche Ursache hoher und schwankender Mortalitäten, da Verhungern nur während der ersten Lebensphase eine Rolle spielt, Räuberdruck aber wesentlich länger als dezimierender Faktor wirken kann

(Hewitt et al. 1985, Bailey & Houde 1989). Dabei kann einerseits Wegfrass von Eiern und Larven durch Invertebraten wie beispielsweise Euphausiden, Gammariden, Amphipoden oder Chaetognathen eine Rolle spielen (Bailey & Stehr 1986, Theilacker et al. 1993, Bailey et al. 1993 Broudeur & Bailey 1996, Yamashita et al. 1996), andererseits wird dem Wegfrass durch juvenile und adulte Fische grosse Bedeutung beigemessen, wobei auch Kannibalismus eine Rolle spielen kann (Grave 1981, Nellen 1986, Fuiman & Gamble 1988, Fuiman 1989, Hunter 1991).

Ein anderer Ansatz versucht die Fluktuationen der grossen Fischbestände mit Veränderungen der physikalischen Konditionen des marinen Lebensraumes und letztendlich der hydrographischen Parameter in Zusammenhang zu bringen. Dabei werden grosskalige Ereignisse wie Änderungen der hydrographischen Bedingungen in Auftriebsgebieten ("El Niño") und Verschiebungen in Frontensystemen unterschieden von kleinskaligen Ereignissen wie beispielsweise Mikroturbulenzen (Rothschild & Osborn 1988, MacKenzie & Legett 1991) und lokale Auftriebserscheinungen die (Taylor-Columns, Eddies) durch Veränderungen der Bodentopographie ausgelöst werden können. Skreslet (1989) untersuchte die "Match-Mismatch" Hypothese unter dem Aspekt der räumlichen Komponente für das Zusammentreffen von Dorschlarven und potentiellen Futterorganismen und dem Einfluss windbedingter Turbulenzen. In seinen Untersuchungen fand er keine räumliche Übereinstimmung zwischen dem Auftreten von Dorschlarven und den Aggregationen von adulten *Calanus finmarchicus*, deren Nauplien als wichtige Nahrungsgrundlage für Dorschlarven gelten. Er fand aber Hinweise, dass die Dottersacklarven in der Lage sind, die durch windbedingte Turbulenzen (Langmuir-Zirkulation) konzentrierten Nauplienpopulationen aktiv aufzusuchen solange sie der Dottervorrat mit ausreichend Energie versorgen kann. Ellertsen et al. (1989) fanden einen Zusammenhang zwischen der Temperatur und den Überlebensraten von jungen Dorschlarven. In diesem Fall wurde festgestellt, dass mehr Larven verhungerten, wenn die Temperaturen von der normalen Spannweite abwichen jedoch die Rekrutierung besonders gut ausfiel, wenn die Temperaturen während der larvalen Phase der Dorsche normale Werte zeigte. Während die in diesem Absatz erstgenannten Ereignisse auffällig sind, weil sie von grosskaligen Veränderungen der physikalischen Umweltparameter (Temperatur, Windstress) ausgelöst werden und direkt mit den Konsequenzen für die Fischbestände in Zusammenhang gebracht werden können, sind die letztgenannten Ereignisse eher unauffällig und die Konsequenzen oft schwer zu erkennen. Tatsächlich werden alle genannten Ursachen in unterschiedlicher und wechselnder Gewichtung Anteil an den unterschiedlichen Überlebensraten von Fischlarven und juvenilen Fischen haben. So werden beispielsweise Fischlarven, die sich in einer schlechten Ernährungslage befinden, durch reduzierte Mobilität auch leichter das Opfer von Räubern (Hewitt et al. 1985, Rice et al. 1987). Selten wird nur ein Ereignis zu einer Zeit die Rekrutierung einer Art in einem Gebiet bestimmen (Sissenwine 1984, Houde 1987).

Mit der intensiven Nutzung der Fischbestände ist der Wunsch nach Vorhersagbarkeit für zukünftige Erträge gewachsen. Das Rekrutierungsergebnis wird in der Regel bei intensiv genutzten Fischbeständen im wesentlichen das Resultat aus der Überlagerung von zwei Ereignissen sein: der anthropogene Eingriff durch Entnahme von adulten Fischen (und damit zukünftigen Elterntieren) und das Einwirken natürlicher Ereignisse (wie sie oben als Ursachen für die Mortalität von Fischlarven aufgezählt wurden) auf die Überlebensraten von Fischlarven und juvenilen Fischen. Unter dem Aspekt dauerhafter maximaler Erträge ergibt sich daher der Wunsch und die Notwendigkeit, neben dem Management der bestehenden Biomasse, die natürlichen Ereignisse in ihrer Wirkung auf Fischlarven quantifizieren und vorhersagen zu können. Die grosse Anzahl unterschiedlicher Ansätze bei den Untersuchungen zu den Ursachen der Mortalität von Fischlarven lässt erkennen, dass sich die Ursachen nicht auf einen ökologischen Teilaspekt beschränken lassen. Die Abb. 1 zeigt, welche Einflüsse bei der Entwicklung vom Ei über die Fischlarve bis zum juvenilen Fisch von Bedeutung sein können.

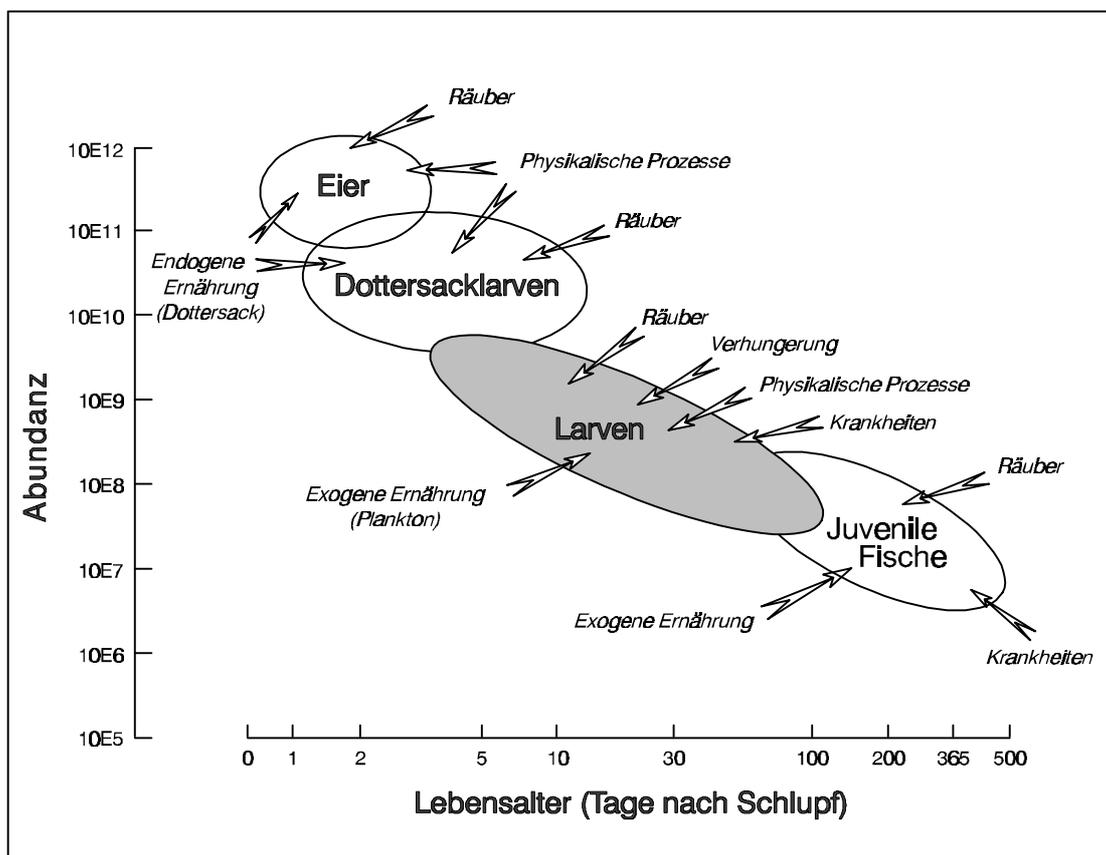


Abb. 1: Einflüsse und Prozesse, die die Bestandsdichte von Fischen auf dem Weg vom Ei über die Larve bis zum juvenilen Fisch bestimmen können (neu gezeichnet nach Houde 1987). Die grau gestrichelte Ellipse bezeichnet den für diese Arbeit relevanten Lebensabschnitt.

Meteorologische, physikalische und hydrographische Grössen (Wind, Temperatur, Strömung, Turbulenzen) lassen sich heute relativ einfach und zuverlässig messen und langfri-

stig überwachen. Ungleich schwieriger ist es, sämtliche die Mortalitätsraten von Fischlarven beeinflussende Faktoren mit genügender Genauigkeit zu ermitteln. Ein Ziel der sich mit dieser Problematik befassenden Fischereiwissenschaft ist es, Modelle zu entwickeln, die alleine mit Hilfe von übergeordneten Informationen wie beispielsweise der Integration der vorherrschenden hydrographischen Bedingungen oder der Messung der Primärproduktion und Zooplanktondichte im Aufwuchsgebiet der Larven Vorhersagen zulassen, ob hohe oder eher geringe Überlebensraten zu erwarten sind. In Einzelfällen mag es dabei schon erfolgreiche Ansätze gegeben haben (z.B. Heath 1989), aber tatsächlich ist man von diesem Ziel durch das sehr komplexen Geschehens im Meer noch weit entfernt. Als gute Näherung an die tatsächlichen Verhältnisse lassen sich für die Larvenstadien der meisten Fischarten die die Gesamtmortalität verursachenden Einflüsse wahrscheinlich auf zwei Schlüsselpositionen reduzieren, wie es den beiden wichtigsten Hypothesen zur Erklärung der hohen Mortalitätsraten bei Fischlarven entspricht: Verhungern und/oder Wegfrass, wobei beide Mortalitätsgründe schon die Auswirkungen verschiedener Variablen in ihrer Wirkung vereinen. Auch wenn physikalische Faktoren die Rahmenbedingungen vorgeben, so sind doch die Verfügbarkeit von geeignetem Futter und Räuberdruck die letztendlich entscheidenden Faktoren für die Überlebensraten von Fischlarven. Aus exemplarischen Anwendungen moderner histologischer und biochemischer Methoden gibt es genügend Hinweise darauf, dass Verhungern eine bedeutende Rolle bei der Gesamtmortalität von Fischlarven im Meer spielen kann (O'Connell 1980, Theilacker 1986, Setzler-Hamilton et al., 1987, Clemmesen 1995, Sieg 1995, Ueberschär 1995).

Nach aktuellen FAO-Studien ist nach der Jahrtausendwende weltweit mit einer Verknappung bei der Nahrungsmittelversorgung zu rechnen, die sich besonders auch auf die Erträge aus der marinen Fischerei bezieht. In diesem Zusammenhang werden zur Zeit ernsthaft Vorschläge zur Manipulation der marinen Nahrungskette diskutiert mit dem Ziel, die Produktivität der Meere durch künstliche Düngung zu erhöhen. Eine solche Massnahme erscheint nur sinnvoll, wenn feststeht, dass regelmässig massenhaftes Verhungern von Fischlarven ursächlich verantwortlich für schlechte Rekrutierungsergebnisse ist. Nur gezielte Felduntersuchungen zum Ernährungszustand von Fischlarven der marinen Massenfischarten können hierauf eine Antwort geben.

Bei der Entscheidung, welche der oben genannten Hypothesen (Verhungern/Wegfrass) in Feldstudien vorrangig zu untersuchen ist, spielt die Messbarkeit der entsprechenden Parameter eine entscheidende Rolle. Aus den Ergebnissen der Messung eines Parameters lässt sich dann unter Umständen die Grössenordnung und Bedeutung des anderen Parameters ableiten. Die Simulation von Wegfrass ist verschiedentlich in Laborversuchen und Mesokosmen durchgeführt und untersucht worden (z.B. Bailey 1984, de Lafontaine & Leggett 1988, Gamble & Hay 1989). Da die Nahrungswahl pelagischer Organismen im Meer eher opportunistisch angelegt ist (Munk 1995), ist durch die Effekte der künstlichen Umgebung eine realistische Abschätzung aber nur schwer möglich (Gamble & Hay 1989). Die quantita-

tive Erfassung von Wegfrass im Meer ist bei Fischeiern möglich, da das Chorion relativ resistent gegen die Verdauungsenzyme der Räuber ist. Mehr als eine qualitative Abschätzung des Wegfrasses von Fischlarven erscheint dagegen eher unmöglich. Die im Laborversuch simulierte Verdaulichkeit von Fischlarven in Fischmägen hat gezeigt, dass schon nach weniger als 10 Minuten Fischlarven als solche nicht mehr zu identifizieren sind (eigene Untersuchungen). Eine zuverlässige quantitative Abschätzung der Sterblichkeit von Fischlarven durch Räuberdruck im Feld scheint nur über die Anwendung eines Immunoassays möglich zu sein (Theilacker et al. 1986, 1993, Brodeur & Bailey 1996), prinzipiell eine sehr aufwendige Methodik, die gegenwärtig auch noch nicht für die Routineanwendung zum biochemischen Nachweis von Fischlarvenproteinen in Fischmägen entwickelt ist.

Die Erfassung der potentiellen Räuberpopulationen als mittelbarer Ansatz birgt auch Unsicherheiten. Alleine der Nachweis von Fischlarvenräubern in einem Aufwuchsgebiet von Fischlarven bedeutet noch nicht, dass tatsächlich ein ökologisch bedeutsamer Wegfrass stattgefunden hat (Frank & Leggett, 1985). Verschiedene Ernährungszustände lassen sich dagegen im Labor unter kontrollierten Bedingungen gut simulieren, so dass ein geeigneter Indikator zur Untersuchung der Ernährungszustände von Fischlarven in Feldproben kalibriert werden kann.

Shelbourne (1957) war einer der ersten, der den Ernährungszustand von Fischlarven mit morphometrischen Methoden untersucht hat. Seitdem führte der Wunsch, den Ernährungszustand von Fischlarven in Felduntersuchungen wie auch in der Aquakultur bestimmen zu können, zu zahlreichen methodischen Ansätzen. Einer der Gründe für die Limitierungen einzelner Methoden sind die ontogenetischen Veränderungen im larvalen Organismus. Deshalb muss bei der Auswahl einer Methode zur Bestimmung des Ernährungszustandes stets der individuelle Entwicklungsstand der zu untersuchenden Larven berücksichtigt werden, um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten (Sieg 1995, Bergeron 1997).

Neben der eher klassischen Methode zur Bestimmung des Ernährungszustandes von Fischlarven auf der Basis von morphometrischen Kriterien (Shelbourne 1957, Ehrlich et al. 1976, Theilacker 1978, Powell & Chester 1985, Reichow 1991) wurden auch chemische Messungen (Ehrlich 1974, 1975, Harris et al. 1986), Lipidanalysen (Fraser et al. 1987, Håkanson 1989b), und histologische Methoden (O'Connell 1976, 1980, Theilacker 1978, 1986, McFazden et al. 1994, Sieg 1992a, 1992b, 1995) zur Beurteilung der Kondition von Fischlarven herangezogen. Die Eigenschaften der verschiedenen Ansätze werden ausführlich in einem Review von Ferron und Leggett (1994) diskutiert. Deshalb soll an dieser Stelle nur kurz auf die Eigenschaften der Indikatoren hingewiesen werden, die bisher in einer nennenswerten Zahl von Untersuchungen zur Bestimmung des Ernährungszustandes von Fischlarven angewendet wurden.

Morphometrische Messungen zur Bestimmung des Ernährungszustandes von Fischlarven basierten zuerst auf dem sog. Fultonschen Konditionsindex (Shelbourne 1957), später auch auf dem Verhältnis verschiedener Körperproportionen als multivariate Morphometrie (Ehrlich et al. 1976, Theilacker 1978, McGurk 1985, Yin & Blaxter 1986, Reichow et al. 1991). Problematisch bei diesem Ansatz sind die altersabhängigen morphologischen Veränderungen bei Fischlarven, die unabhängig vom Ernährungszustand sind und die Übertragung der Laborergebnisse auf Fischlarven unterschiedlichen Alters aus Feldproben erschweren (Martin & Wright 1987). Die unterschiedlichen Fischlarvenformen (wie z.B. Herings- und Steinbuttlarve) erfordern zudem die Festlegung von artspezifischen morphometrischen Proportionen, die geeignet sind den Ernährungszustand darzustellen. Die Konservierung von Fischlarven für morphometrische Vermessungen verursacht in der Regel Schrumpfungen, die die Messungen in unterschiedlicher Weise beeinflussen können.

Chemische Indikatoren wie das C/N- Verhältnis zur Darstellung des relativen Verhältnisses von Lipiden zu Proteinen, erwiesen sich als unzuverlässig (May 1971, Kiørboe et al 1987), da die Trennschärfe zwischen hungernden und gefütterten Larven zu gering war.

Der Quotient aus dem Gesamtproteingehalt von Fischlarven zur Körpermasse zeigte keinen ausreichenden Effekt auf Futterentzug (Buckley 1979). Eigene Untersuchungen ergaben eine ungenügende Trennschärfe zwischen gefütterten und hungernden Gruppen beim absoluten Proteingehalt in Herings- und Steinbuttlarven, besonders bei den jüngeren Stadien (Ueberschär 1985). Fischlarven besitzen Regulationsmechanismen, um ihre Schwebfähigkeit in Beziehung zur Temperatur und Salzgehalt ihrer Umgebung durch Modifikation des Protein- und Lipidanteils an der Gesamtkörpermasse anpassen können (Guisande et al. 1998). Damit beeinflusst eine weitere Variable, die nicht von der Ernährungssituation abhängt, die Schwankungen beim Proteingehalt.

Lipidanalysen scheinen grundsätzlich geeignet zu sein, den Ernährungszustand von Fischlarven zu bestimmen, jedoch sind die gegenwärtig verwendeten chromatographischen Methoden nicht empfindlich genug, um die geringen Lipidmengen in jüngeren Fischlarven individuell und differenziert darzustellen (Gatten et al. 1983, Ferron & Leggett 1994). Die Lipidfraktionen lassen sich lediglich in Sammelproben darstellen. Fortschritte scheinen aber über die Anwendung fluoreszenzphotometrischer Techniken möglich zu sein (Gleeson et al. 1986). Fraser et al. (1987) fanden die Übertragbarkeit von Ergebnissen aus der normalen Laboraufzucht als kritisch und empfehlen "Enclosure"-Experimente zur Gewinnung von Kalibrierungsdaten. Ein weiteres Problem der Fettsäureanalyse bei Fischlarven im Zusammenhang mit der Bestimmung des Ernährungszustandes wird von Lochmann et al. (1996) diskutiert. Er stellte fest, dass 4 bis 95% (im Mittel 56%) der gemessenen Lipidfraktionen in Dorschlarven exogenen Ursprungs waren und führt weiter aus, dass dies zu Problemen führen kann im Zusammenhang mit der Bestimmung der Kondition in Fischlarven über die

Lipidanalyse. Im übrigen gilt dieselbe Variabilität durch Veränderung der Schwebfähigkeit wie bereits oben bei der Proteinbestimmung erwähnt wurde.

Histologische Analysen gelten als ein gutes Werkzeug, um Ernährungszustände auch im Zusammenhang mit der Entwicklungsstufe der Fischlarven differenziert und individuell darzustellen. Als Nachteile der histologischen Methode stehen einem umfangreichen Informationsgewinn die Notwendigkeit einer relativ grossen Erfahrung des Begutachters bei der Interpretation der histologischen Bilder und ein umfassender präparativer Aufwand gegenüber (Sieg 1995).

Indikatoren, die über biochemische Analysen den Ernährungszustand von Fischlarven beschreiben können, liefern einen präzisen und reproduzierbaren Messwert, der bei geeigneter Kalibrierung auch von einem weniger geübten Beobachter interpretiert werden kann und der es gestattet, mit einer etablierten Methode in kurzer Zeit grössere Larvenzahlen zu analysieren, was ein wichtiges Kriterium für den regelmässigen Einsatz dieser Untersuchungen in der Feldforschung ist. Als geeignete, mit biochemischen Methoden zu bestimmenden Indikatoren wurden dabei neben der Analyse der Nukleinsäuren (RNA/DNA-Verhältnis, Buckley 1979, 1980, 1984, Clemmesen 1988, 1992, 1996, DNA/Trockengewicht und DNA/C, Bergeron 1997) die Aktivität der proteolytischen Verdauungsenzyme, insbesondere die Trypsinaktivität, identifiziert (Ueberschär 1988). In der vorliegenden Studie wurde deshalb die Eignung der Trypsinaktivität zur Darstellung von Ernährungszuständen bei Fischlarven unter verschiedensten Aspekten detailliert untersucht.

Trypsin ist ein Sammelbegriff für verschiedene, strukturell unterschiedliche Formen einer sehr wichtigen und quantitativ dominanten Endoproteinase, welche wesentlich an der extrazellulären Proteolyse des mit der Nahrung aufgenommenen Proteins beteiligt ist. Trypsin ist ein primäres Verdauungsenzym, das weit verbreitet ist und in praktisch allen tierischen Organismen vorkommt. Die Abb. 2 zeigt eine Auswahl von marinen Organismen, bei denen Trypsinaktivitäten festgestellt wurden. Die Werte sind artspezifisch und typisch für die jeweils angegebenen Grössenverhältnisse (eigene Messungen).

Trypsin ist in seiner Wirkungsweise, wie die meisten Enzyme, sehr substratspezifisch und hydrolisiert nur Peptidbindungen an der Carboxylgruppe der geladenen, hydrophilen Aminosäuren Arginin und Lysin, wobei als Reaktionsprodukte Oligopeptide entstehen (Löffler et al. 1985). Trypsin gehört neben Chymotrypsin und Elastase zu den Proteinasen, die bei Vertebraten als inaktive Vorstufe (Zymogene) im exokrinen Teil des Pankreas synthetisiert werden. Bezogen auf Trypsin handelt es sich hier um das sog. Trypsinogen. Die Aktivierung von Trypsinogen erfolgt im Darmlumen zuerst durch Enterokinase und dann autokatalytisch durch Trypsin selber. Hierbei werden auch die inaktiven Vorstufen anderer Zymogene, beispielsweise vom Chymotrypsin, aktiviert. Trypsin nimmt in diesem kaskadenartigen System daher eine Schlüsselstellung ein.

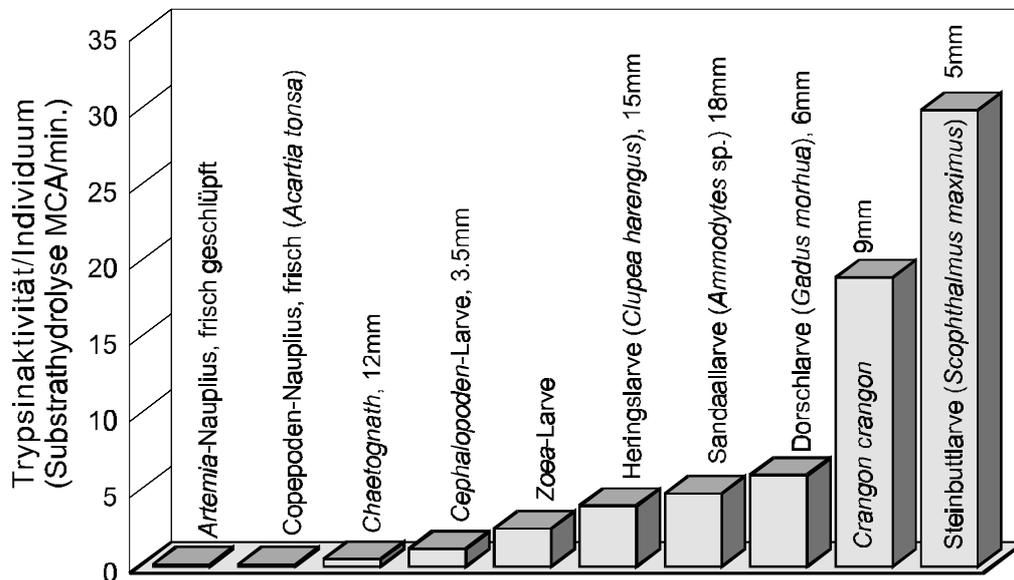


Abb. 2: Beispiele für die Verbreitung des proteolytischen Enzyms Trypsin in marinen Organismen (Fischlarven und Evertebraten). Die Trypsinaktivitäten sind als typische Werte für die untersuchten Organismen in der angegebenen Grösse zu verstehen. Alle Werte basieren auf Untersuchungen des Autors dieser Arbeit.

Die Regulierung der Trypsinogenproduktion und die Sekretion von Trypsinogen in das Duodenum erfolgt primär in Reaktion auf Nahrungsaufnahme. Als Stimuli wurden bei Fischlarven visuelle Reize, Geruch und Geschmack der Nahrung sowie die Nahrungsart und Grösse (Dehnungsrezeptoren) und "Schlüsselmoleküle" (aus der Nahrung) im Verdauungstrakt diskutiert (Hjelmeland et al. 1988, DeMott 1989, Pedersen 1993, Hjelmeland 1995). Dieser teilweise äusseren, teilweise inneren Stimulation folgt die sekundäre Regulation über ein Peptidhormon, das Cholecystinin (CCK, Grendell et al. 1984, Plantikow et al. 1993), das die Sezernierung von Trypsinogen in das Duodenum über einen neuronalen Regelkreis stimuliert; umgekehrt besteht offenbar auch ein Mechanismus, der die Fischlarven in die Lage versetzt, physiologisch unsinnig hohe Trypsinkonzentrationen im Darmlumen zu verhindern (Pedersen & Hjelmeland 1988, Pedersen 1993).

Wachstum bei Fischlarven lässt sich biochemisch im wesentlichen als eine Funktion der Menge an verfügbaren Aminosäuren aus Nahrungsproteinen zur Synthese körpereigenen Proteins beschreiben (Kjørbo et al. 1987, Kjørbo 1989, Dabrowski and Culver 1991). Da Fischlarven bis zum Beginn der Metamorphose in der Regel keinen funktionsfähigen Magen besitzen (Blaxter & Hunter 1982, Mähr 1983), kommt den alkalischen Proteinase und unter diesen besonders dem Trypsin bei der Proteinverdauung quantitativ eine Schlüsselrolle zu.

Trypsin wirkt dabei an der extrazellulären Schnittstelle zwischen aufgenommenen Futter und der Einschleusung von Proteinmolekülen in das intrazelluläre System. Der direkte und unmittelbare Zusammenhang von Produktion und Sezernierung von Trypsin in Beziehung zur Futteraufnahme und den Verdauungsprozessen (Hjelmeland 1995) liess Trypsin als gut geeigneten Indikator zur Beurteilung des Ernährungszustandes von Fischlarven erscheinen.

So wurde in der jüngeren Vergangenheit in verschiedenen Laborexperimenten die Bedeutung von Trypsin für den larvalen Organismus und der Zusammenhang zwischen der Ernährung und der Trypsinaktivität untersucht und grundsätzlich eine Korrelation zwischen Ernährungszustand und der Aktivität von Trypsin gefunden (Dabrowski 1982, Govoni et al. 1986). Hjelmeland et al. (1984), quantifizierten den Trypsin- und Trypsinogengehalt in Dorschlarven mit Hilfe eines Radioimmunoassays und schlugen den Trypsin/Trypsinogengehalt als Indikator für Wachstum und Ernährungszustand bei Fischlarven vor. Pedersen et al. (1987) fanden eine positive Korrelation zwischen dem Trypsin/Trypsinogengehalt und der Futterration in Heringslarven. Eigene Laborexperimente über die Verdauungsenzyme in Herings- und Steinbuttlarven zeigten regelmässig geringere Trypsinaktivitäten bei hungrigen Larven (Ueberschär 1985). Mit diesem Stand des Wissens lag es nahe, die Trypsinaktivität als Indikator für den Ernährungszustand von Fischlarven aus Feldproben vorzuschlagen. Als zugrundeliegendes Prinzip konnte aus dem bisherigen Wissen über Trypsin bei Fischlarven abgeleitet werden, dass sich die Bereitstellung von Verdauungsenzymen am Bedarf orientiert. Bei hohem Nahrungsangebot wird eine grosse Menge an Trypsin bereitgestellt, während bei geringem Nahrungsangebot oder unter Futterentzug nur geringe Mengen Trypsin im Darmlumen nachzuweisen sind. Enzymsynthese und -hemmung sind eng gekoppelt an die Menge ihrer Substrate (hier gleichbedeutend mit der Nahrungsmenge im Darmtrakt von Fischlarven), was physiologisch eine sinnvolle Regulation darstellt, um Stoffwechselforgänge energetisch zu optimieren. In der Abb. 3 werden diese Zusammenhänge zwischen Futterangebot und Trypsinaktivität bei Fischlarven hypothetisch dargestellt.

Um die Bedeutung der "Verhungerungshypothese" für die Rekrutierungsschwankungen in Felduntersuchungen mit Hilfe der Bestimmung des Ernährungszustandes von Fischlarven über die Trypsinaktivität prüfen zu können, ist eine individuelle Analyse einzelner Fischlarven Voraussetzung. Die konventionellen chromogenen Methoden sind aber zu unempfindlich, um die Trypsinaktivität differenziert in einzelnen Fischlarven darstellen zu können. Je nach Larvengrösse- und Art müssen 5-30 Fischlarven gesammelt analysiert werden (z.B. Alliot et al. 1977, Dabrowski 1982, Baragi & Lovell 1986, Lauff & Hofer 1984, Ueberschär 1985, Zambonino-Infante 1996). Damit lässt sich aber der Anteil hungernder Fischlarven und die individuelle Variabilität in Feldproben nicht bestimmen. Um die in dieser Arbeit gestellten Fragen beantworten zu können, wurde deshalb zunächst ein Messverfahren entwickelt, mit dem die Trypsinaktivität in Fischlarven individuell dargestellt werden konnte. Auf der Basis konventioneller chromogener Methoden wurde mit Hilfe von fluoreszenzphotometrischen Techniken ein analytisches Verfahren entwickelt, mit dem auch schon bei den

jüngsten Larvenstadien die Trypsinaktivität individuell in einzelnen Fischlarven bestimmt werden kann.

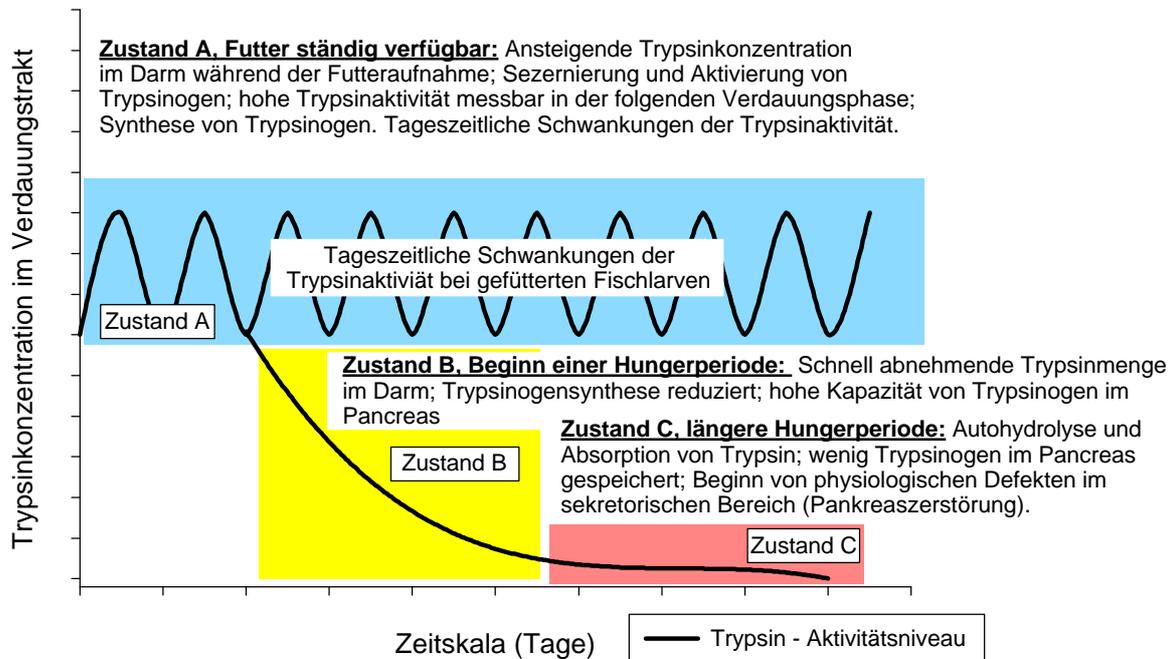


Abb. 3: Hypothese zum Verhalten der Trypsinaktivität bei regelmässig gefütterten und hungernden Fischlarven. Während die Trypsinaktivität bei gefütterten Larven im Tagesverlauf auf einem hohen Niveau in Abhängigkeit von der Nahrungsration regelmässig oszilliert, nimmt die Trypsinaktivität in hungernden Fischlarven exponentiell ab, dieser Verlauf ist schematisierend in 3 Zustände (A, B und C) eingeteilt.

Aus früheren Experimenten war bekannt, dass die Trypsinaktivität artspezifische Unterschiede aufweisen kann (Ueberschär 1985). Um die Trypsinaktivität als Indikator für den Ernährungszustand von im Feld gefangenen Larven sinnvoll einsetzen zu können, sind deshalb zunächst detaillierte Laboruntersuchungen erforderlich. Die Abb. 4 zeigt schematisch, welche Schritte von der Laborkalibrierung zur Feldanwendung führen. In dieser Studie wurden die Larven von 6 verschiedenen Fischarten unter kontrollierten abiotischen Bedingungen sowie unterschiedlichen Ernährungsbedingungen im Labor aufgezogen und die Trypsinaktivität in Beziehung zum Larvenalter und der Larvenlänge betrachtet. Im einzelnen sollte detailliert geprüft werden, wie sich der Indikator Trypsinaktivität unter dem Einfluss verschiedener Variablen wie Futterdichte, Futterentzug und Temperatur verhält. Im Zusammenhang mit der Futteraufnahme (Fressaktivität) und der Futterration wurde geprüft, ob und in welchem Umfang tageszeitliche Schwankungen der Trypsinaktivität zu beobachten sind.

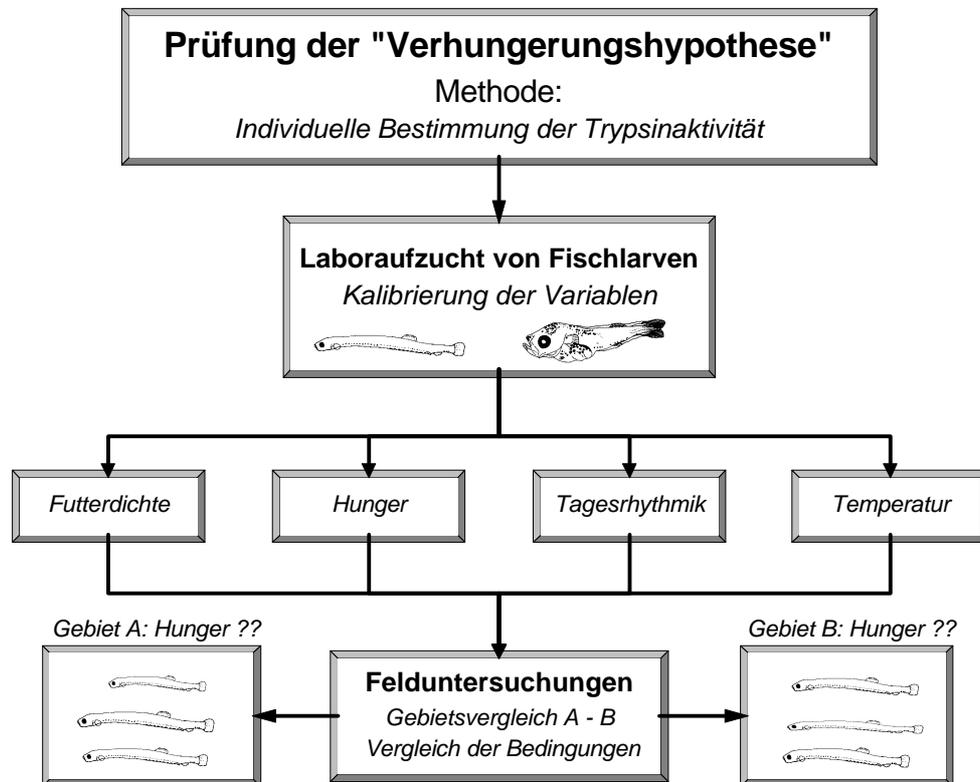


Abb. 4: Trypsinaktivität als Indikator zur Bestimmung des Ernährungszustandes von Fischlarven aus Feldproben: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte von der Laborkalibrierung bis zur Feldanwendung.

Die Ergebnisse dieser Laborkalibrierungen konnten dann auf Fischlarven von 6 Arten aus Feldproben aus unterschiedlichsten Gebieten übertragen werden. Bei Arten aus Feldproben, für die eine Laborkalibrierung vorlag, konnten die Kalibrierungsdaten direkt übertragen und so der Anteil hungernder Larven abgeschätzt werden. Für Arten, die in dieser Arbeit nicht kalibriert werden konnten, wurden verschiedene Verfahren zur artenunabhängigen Abschätzung des Ernährungszustandes geprüft.

Die in dieser Arbeit untersuchten Fragen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Kann die Trypsinaktivität in Fischlarven unterschiedlicher Arten und aller Altersstufen individuell und reproduzierbar gemessen werden?
- Ist die Trypsinaktivität ein geeignetes Mass, um den Ernährungszustand und die Fressaktivität von Fischlarven darzustellen?
- Wie kann die Trypsinaktivität in Felduntersuchungen als Indikator zur Abschätzung des Ernährungszustandes und der Futteraufnahme eingesetzt werden?

2. Material und Methoden

2.1 Biochemische Analytik

Auf der Basis konventioneller chromogener Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten (Erlanger et al. 1961, Bergmeyer 1977 & 1983, Ueberschär 1985) wurde eine hochempfindliche Fluoreszenztechnik zur Bestimmung von Trypsinaktivitäten in Fischlarven entwickelt. Im direkten Vergleich mit der konventionellen Methode, die z.B. auch vom Autoren in früheren Untersuchungen zur Trypsinaktivitäten bei Fischlarven angewendet wurde, konnte mit Hilfe der fluoreszenzphotometrischen Methode eine Empfindlichkeitssteigerung um etwa den Faktor 100 ohne einen wesentlich höheren apparativen Aufwand erreicht werden. Im folgenden Abschnitt werden die methodischen Details beschrieben, die zur Entwicklung einer zuverlässigen und reproduzierbaren Analyse der Trypsinaktivität notwendig waren.

2.1.1 Chemikalien

Die Qualitätsanforderungen an die verwendeten Reagenzien, besonders vor dem Hintergrund der angestrebten Empfindlichkeit der Fluoreszenztechnik (die geringste, noch messbare Konzentration sollte im Bereich von 10^{-9} g liegen), mussten besonders hoch sein. Alle verwendeten Chemikalien waren deshalb analysenrein ("pro analysi") oder mindestens von der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe ("reinst"). Für die Analytik wurden im einzelnen folgende Lösungen und Substanzen verwendet:

Tris(hydroxymethyl)aminomethan ($C_4H_{11}NO_3$, TRIS, MERCK Art. Nr. 8382) zur Herstellung von Puffergemischen sowie Calciumchlorid-Dihydrat ($CaCl_2 \times 2H_2O$, MERCK 2382). Aus diesen beiden Substanzen wurde der 0.1 molare TRIS-HCL Puffer hergestellt, der mit konzentrierter Salzsäure (37%) auf den gewünschten pH-Wert eingestellt wurde. Ca^{2+} -Ionen sollen der Aggregation von Trypsinmolekülen und damit der Bildung von inaktivem Trypsin vorbeugen (McDonald und Kunitz 1946). Zum Ansetzen des Puffers wurde besonders reines Wasser aus einer MILLIPORE-Anlage verwendet. Wenn in den folgenden Abschnitten die Verwendung von TRIS-HCl Puffer erwähnt wird, so handelt es sich um den Puffer mit der hier beschriebenen Zusammensetzung.

Die Enzymsubstrate $N\alpha$ -carbobenzoxy-L-arginin-4-methylcoumarinyl-7-amid (CBZ-L-Arg-MCA, Art. Nr: I-1130) und $N\alpha$ -Benzoyl-L-arginin-4-methylcoumarinyl-7-amid (BZ-L-Arg-MCA, Art. Nr.: I-1070) sowie der reine Fluoprophor 4-methylcoumarinyl-7-amid (MCA, Art. Nr. Q-1025) wurden von der Firma BACHEM, Heidelberg, bezogen. Der Trypsinstandard (Trypsin vom Rinderpancreas, 2x crist. und lyophilisiert, 32U/mg, Art. 37260), Albumin (BSA, Art. Nr. 11924) und ein Trypsininhibitor (Inhibitor aus Hühnereiweiss "Egg-White", 35U mg^{-1} , salzfrei, Art. Nr. 37310) sowie das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO, Art.

Nr.: 20385) wurden von der Firma SERVA, Heidelberg, bezogen. Trypsinogenstandard (T-1143, Rinderpankreas, 500 BAEE U mg⁻¹ Protein) und Enterokinase (E-0885, Schweinedarm, 165 U mg⁻¹ Protein) wurden von der Firma SIGMA bezogen.

2.1.2 Präparation der Fischlarven

Die Wirkungsspezifität von Enzymen gestattet es, z.B. in einem Homogenat aus Zellgewebe gezielt die katalytische Aktivität eines Enzyms zu bestimmen, indem ein nur für dieses Enzym spezifisches Substrat eingesetzt wird. Das hier als Indikator für die Kondition ausgewählte Trypsin gehört zu der Gruppe der Serin-Proteinasen (EC 3.4.21.4). Diese Hydrolasen sind meistens kleine, globuläre Proteine von relativ grosser Stabilität (Lehninger 1977). Deshalb ist der Aufwand für die Präparation von Fischlarven mit dem Ziel, die Trypsinaktivität im Verdauungstrakt dieser Larven zu bestimmen, relativ unproblematisch. Besondere Schutzmassnahmen und aufwendige Reinigungsschritte sind nicht erforderlich. Eine wesentliche Voraussetzung für reproduzierbare Ergebnisse ist aber, dass die Proben bis zur Analyse bei sehr niedrigen Temperaturen (< -50°C) gelagert werden, um jede enzymatische Veränderung auszuschliessen, und dass ferner während der Aufarbeitung eine ständige Eiskühlung der Proben in jedem Aufschlusszustand erfolgt. Nach dem folgenden Schema wurden alle in dieser Arbeit analysierten Fischlarven behandelt.

Die Eppendorf-Reaktionsgefässe mit den Fischlarven wurden in der für den jeweiligen Messtag benötigten Anzahl der Tiefkühltruhe entnommen und auf Eis bei etwa 0°C langsam aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde jeweils der Inhalt eines Reaktionsgefässes (ca. 10 Larven) vorsichtig mit deionisiertem Wasser in eine kleine Petrischale (Ø 5cm) gespült. Anschliessend wurde jeweils eine einzelne Fischlarve in eine andere, eisgekühlte Petrischale überführt, unter einem Binokular auf Beschädigungen geprüft, die Standardlänge (SL) mit einer Genauigkeit von 0.5 mm bestimmt (als Längenmass wurde die Standardlänge gewählt, da bei Fischlarven aus Feldproben häufig die Caudalflosse so beschädigt ist, dass die Totallänge nicht ausreichend präzise bestimmt werden kann), die Larve mit deionisiertem Wasser gespült und mit Hilfe einer Federstahlpinzette in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäss (1.5 ml) überführt. In Abhängigkeit von der Larvengrösse wurden jeweils 250-500µl eisgekühlter TRIS-HCl-Puffer (pH 8.00, 0.1 Molar + CaCl₂ x 2H₂O, 0.02 Molar) zu der Larve pipettiert und die Larve mit Hilfe eines Mikropistills für Eppendorf-Reaktionsgefässe (Eppendorf Art. Nr. 0030-120.973) nach dem "POTTER-ELVEHJEM"-Prinzip direkt im Reaktionsgefäss unter Eiskühlung homogenisiert. Auf diese Weise lassen sich Überführungsverluste und Kontaminationen vermeiden.

Wegen der Empfindlichkeit der fluoreszenzphotometrischen Analytik muss vor der Messung eine Klärung des Rohhomogenates erfolgen. Dazu wurden die Proben in einer gekühlten Zentrifuge (HEREUS Minifuge T) bei 0° bis 4°C und 4110 x g genau 60 min. zentrifugiert. Bei diesem Zentrifugationsschritt lagern sich grössere Zelltrümmer als Pellet im Konus des Reaktionsgefässes ab und können die Messung nicht mehr durch Interferenz und schwan-

kende Eigenfluoreszenz stören. Aus dem Überstand kann dann direkt die benötigte Menge Homogenat für die Enzymaktivitätsbestimmung entnommen werden.

Die Abb. 5 gibt einen Überblick über die einzelnen Schritte der Prozedur vom Aufschluss der Larvenenzyme bis zur Messung der Enzymaktivität.

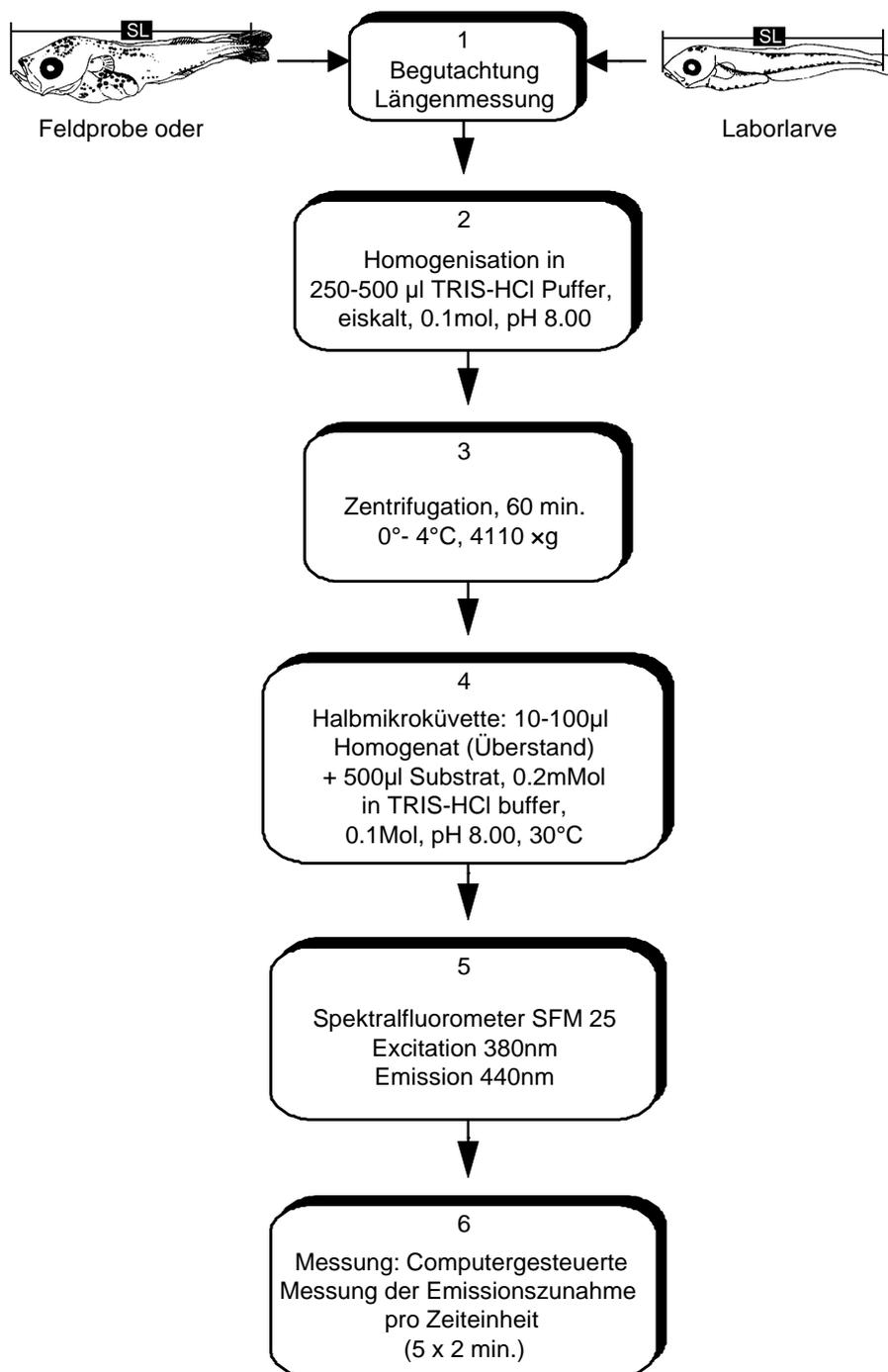


Abb. 5: Das Flussdiagramm zeigt im Überblick die einzelnen Schritte, die von der ganzen Larve bis zur Messung der Enzymaktivität am Fluoreszenzphotometer führen.

2.1.3 Fluoreszenzphotometrische Messung der Enzymaktivitäten

Die indirekte Bestimmung der Trypsinmenge in einer Fischlarve kann durch die Messung der katalytischen Aktivität dieses Enzyms nach folgendem Prinzip fluoreszenzphotometrisch erfolgen: Dem Enzym wird ein synthetisches Substrat angeboten, das hochspezifisch nur für dieses eine Enzym ist. Das Substrat ist mit einem fluoreszierenden Molekül (Fluoreszenzchromophore, im folgenden als Fluorophore bezeichnet) gekoppelt. Im Grundzustand haben solche Substrate meist schon eine geringe Eigenfluoreszenz. Liegen die fluoreszierenden Substanzen aber frei vor, haben sie eine vielfach höhere Fluoreszenz. Dieser Unterschied wird zur Enzymaktivitätsbestimmung genutzt. Durch die katalytische Aktivität des Enzyms wird eine bestimmte Menge Fluorophore pro Zeiteinheit freigesetzt. Je mehr Enzyme aktiv sind, um so schneller erfolgt die Freisetzung. Die Geschwindigkeit der Freisetzung kann fluoreszenzphotometrisch verfolgt werden und ist der Quantität des jeweiligen Enzyms direkt proportional. Der grosse Vorteil einer solchen Ratenmessung gegenüber einer Einpunktmessung ist, dass unterschiedliche Eigenfluoreszenzen der Proben (begründet durch die unterschiedliche Grösse und Gewebeeigenschaften der zu untersuchenden Organismen) bei der Messung nicht berücksichtigt werden müssen.

Dem beschriebenen Prinzip folgend, wurde den Trypsinmolekülen im Fischlarvenhomogenat das synthetische Substrat CBZ-L-Arg-MCA angeboten. Dabei handelt es sich um ein synthetisches Amid, bei dem die Aminosäure Arginin an eine fluoreszierende Gruppe, dem Fluorophor 4-methylcoumarinyl-7-amid (MCA), gekoppelt ist. Trypsin spaltet als Endoprotease Peptidbindungen am Arginin, deshalb ist dieses Substrat hochspezifisch für Trypsin. Im Grundzustand ist dieses Substrat bei einer Excitationswellenlänge von 380nm und einer Emissionswellenlänge von 440 leicht fluoreszierend, der frei vorliegende Fluorophor hat aber bei den genannten Wellenlängen eine etwa 700fach höhere Fluoreszenz. Die Synthese und Eigenschaften dieses Substrates werden bei Kanaoka et al. (1977) beschrieben. Das Prinzip der hier angewandten Messung ist in der Abb. 6 illustriert.

Fluorimetrische Messmethoden beruhen auf der Anregung eines zur Fluoreszenz befähigten Farbstoffs. Die vom Fluorophor emittierten Lichtquanten werden gemessen, die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Intensität der anregenden Strahlung. Durch ein Verstärken der Lichtquelle ist eine Steigerung der Fluoreszenzintensität möglich. In der Absorptionsphotometrie dagegen lässt sich die Extinktion durch eine Erhöhung der Lichtintensität nicht wesentlich steigern. Damit unterscheidet sich die fluoreszenzphotometrische Analyse prinzipiell von der Absorptionsphotometrie und erklärt die höhere Empfindlichkeit um den Faktor 100 - 1000. Andererseits bedeutet dies, dass auch die Anfälligkeit für störende Einflüsse um ein vielfaches höher ist und besondere Sorgfalt bei der Handhabung und Reinigung der verwendeten Gerätschaften und Küvetten erforderlich ist. Bei dieser Arbeit wurden alle in die Messung direkt mit einbezogenen Glasgeräte und Küvetten vor jedem Gebrauch mit rauchender Salpetersäure (65%) gereinigt. Für die Spülung der Küvetten zwischen den einzelnen Messungen war deionisiertes Wasser ausreichend.

An jedem Messtag wurde das Substrat frisch angesetzt. Da das Substrat in Wasser unlöslich ist, wurde es zunächst in Dimethylsulfoxid (DMSO, 0.5% v/v) vorgelöst und dann mit TRIS-HCl Puffer (pH 8.00, 0.1 Molar + $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.02 Molar) auf die geforderte Konzentration von 0.2 mMol verdünnt. Die Endkonzentration in der Küvette war bei dieser Ausgangskonzentration des Substrates 0.17 mMol. Während der Messungen wurde das Substrat bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

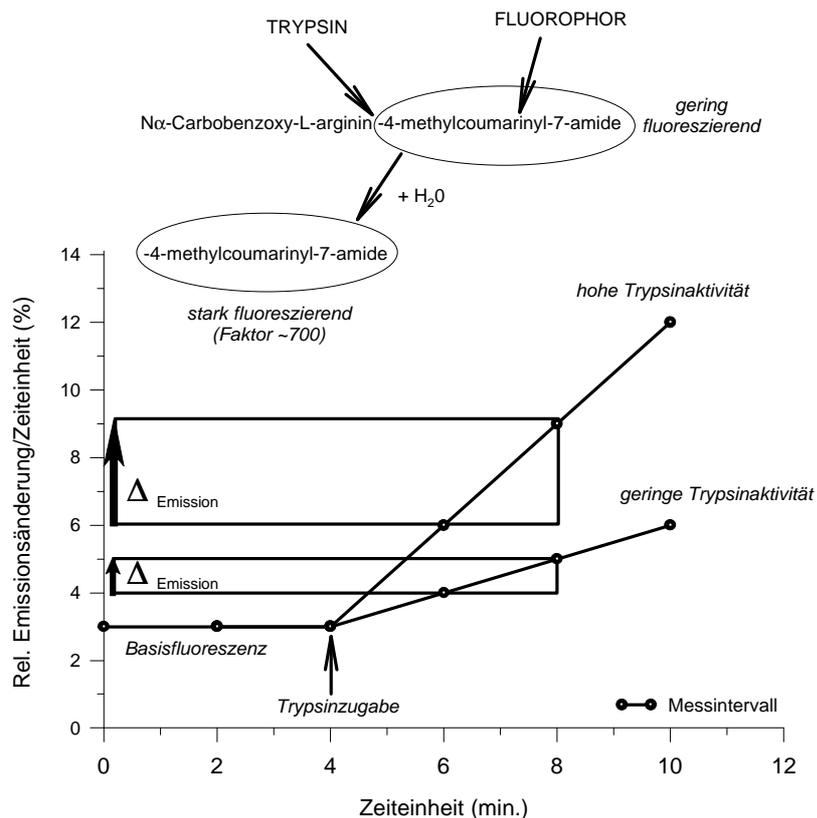


Abb. 6: Das Prinzip der Trypsinaktivitätsbestimmung mit Hilfe einer hochempfindlichen, fluoreszenzphotometrischen Methode. Der Anstieg der Fluoreszenz pro Zeiteinheit ist proportional zur Trypsinmenge im Larvenhomogenat.

Die fluorimetrischen Messungen wurden an einem KONTRON Spektralfluorometer SFM 25 mit einem temperierbaren und über ein Computerprogramm steuerbaren 4-fach Küvettenhalter durchgeführt. Die Kalibrierung des Gerätes musste an jedem Messtag neu durchgeführt werden, um technische Veränderungen (Lampenspannung, Alterung usw.) auszugleichen und um stets mit derselben Geräteempfindlichkeit zu messen. Dazu wurde die Kalibrierungsfunktion des Gerätes benutzt. Zur Kalibrierung wurde einfach deionisiertes Wasser verwendet. Bei der Wellenlängenkombination von 380 und 440 nm ist deionisiertes Wasser gut geeignet, da die RAMAN-Bande von Wasser nicht im Bereich der verwendeten Emissionswellenlänge liegt (Raman-Streuung: Streueffekt durch Valenz- und Rotationschwingungen der Lösungsmittelmoleküle, Perkin-Elmer 1978) und es immer in gleichblei-

bender Qualität und Reinheit zur Verfügung stand. Zur Messung wurden je nach aus Erfahrung zu erwartender Enzymkonzentration zunächst 10- 100µl vom Überstand des Larvenhomogenats in Halbmikroküvetten aus Quarzglas pipettiert (HELLMA, Typ 104F-QS, Schichtdicke 10 mm), dann 500µl Substrat zugegeben und mit einem Rührspatel vermischt. Die Gesamtmenge des Reaktionsgemisches in der Küvette betrug aber immer 600µl. War die Homogenatmenge geringer als 100µl, wurde die Differenz durch Zugabe von TRIS-HCL Puffer ausgeglichen. Der Anstieg der Emission wurde computergesteuert in 5 Intervallen alle 2 min. gemessen, gemittelt und die Aktivität als umgesetztes (hydrolysiertes) Substrat pro Zeiteinheit (min.) angegeben.

Alle Messungen wurden bei einer Solltemperatur von 30°C durchgeführt. Die Einhaltung einer konstanten Temperatur während der Messungen war besonders wichtig. Einerseits ist die Aktivität von Enzymen bei *in vitro* Messungen von der Temperatur des Mediums abhängig ($\pm 1^\circ\text{C}$ können eine Änderung der enzymatischen Aktivität um bis zu $\pm 10\%$ bewirken, RGT-Regel¹), andererseits bewirken höhere Temperaturen prinzipiell eine Verringerung des Emissionssignals (Guilbault 1973). Vor dem Start eines Messzyklus war daher eine Wartezeit einzuhalten, bis das Reaktionsgemisch in allen 4 Küvetten eine gleichmässige Temperatur aufwies. Die Abb. 7 zeigt den Verlauf der Temperaturgradienten für alle vier Küvettenplätze. Um die Präzision der fluoreszenzphotometrischen Messung abschätzen zu können, wurde regelmässig zu Beginn eines jeden Messtages eine Probe dreifach gemessen. Die Schwankungsbreite wurde durchschnittlich mit $\pm 5.13\%$ bestimmt.

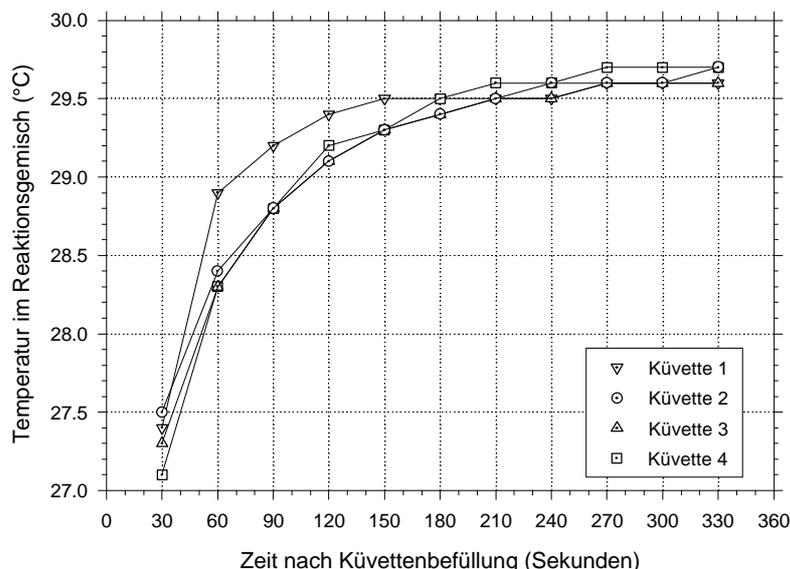


Abb. 7: Der Verlauf der Temperaturgradienten nach Befüllung der Küvetten mit Homogenat und Substrat. Nach etwa 3 min. sind gleichmässige Temperaturverhältnisse in allen Küvetten erreicht und die Messung kann gestartet werden.

¹ Reaktions - Geschwindigkeits - Temperatur - Regel nach van 't Hoff

2.1.4 Eichung, Linearität und Proportionalität der Enzymaktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität in verschiedenen Experimenten unter Anwendung einer bestimmten Methode sind nur dann direkt vergleichbar, wenn jeweils die für diese Methode optimalen Versuchsbedingungen eingehalten werden. Deshalb werden in den folgenden Abschnitten die Randbedingungen für die in dieser Arbeit entwickelten Messmethode zur Trypsinaktivitätsbestimmung genauer beschrieben.

Ein wichtiges Kriterium zur Brauchbarkeit einer Messmethode für die Bestimmung enzymatischer Aktivität ist die Reproduzierbarkeit. Dazu gehört u. a. die Linearität bei der Messung, d.h. dass die Änderung der Emission pro Zeiteinheit linear zunimmt, zumindest während der gesamten Messdauer einer Probe (in diesem Fall mindestens 10 Minuten). Ein weiteres Kriterium ist die Proportionalität, d.h. z.B., dass aus der Verdoppelung der Enzymmenge in einer Probe auch eine Verdoppelung der Emission in derselben Zeiteinheit resultiert. Werden diese Kriterien erfüllt, ist die Vergleichbarkeit, in dieser Arbeit konkret zwischen den verschiedenen Larvengrößen und unterschiedlichen Arten, gewährleistet.

Unter Verwendung von Standardtrypsin (2x lyophilisiertes Trypsin aus Rinderpankreas, SERVA, 32U mg⁻¹) und gereinigtem Heringstrypsin² wurden zunächst Eichkurven erstellt. Vom Trypsinstandard wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 0.01 mg Trypsin ml⁻¹ + 0.1 mg ml⁻¹ Bovin-Serum-Albumin (BSA) in 0.1 molarem TRIS-HCl-Calcium Puffer, pH 8.00, hergestellt. Das BSA im Trypsinstandard soll eine natürliche Proteinmatrix imitieren und so eine Autolyse der Trypsinmoleküle verhindern. Aus der Trypsinstammlösung wurden dann 7 geeignete Verdünnungen hergestellt, die den Bereich der in den Larvenproben erwarteten enzymatischen Aktivität abdecken sollten. Als geringste noch nachweisbare Konzentration des Standardtrypsins wurden 0.16 ng ml⁻¹ (0.512 x 10⁻⁵ U) gefunden. Als höchste Konzentration waren 16.6 ng ml⁻¹ ausreichend (53.12 x 10⁻⁵U). Das gereinigte Heringstrypsin hatte eine Ausgangskonzentration von 0.13 mg Enzymprotein ml⁻¹. Daraus wurde durch Verdünnung mit TRIS-HCl Puffer eine Stammlösung von 2.6 µg Trypsin ml⁻¹ hergestellt und daraus wiederum 8 geeignete Verdünnungen im Bereich von 2.13 ng – 430 ng ml⁻¹ für die Eichung verwendet. Zur Kontrolle der Methode und zur Prüfung der Reinheit des Heringslarventrypsins wurden parallel zu jeder Konzentration auch Proben mit einem spezifischen Trypsininhibitor versetzt und gemessen. Dazu wurde eine Stammlösung mit Inhibitor aus Hühnereiweiss hergestellt (0.1 mg ml⁻¹) und daraus 5 µl zu den Proben in der Küvette pipettiert. Als Endkonzentration in der Küvette ergaben sich daraus 0.5 µg ml⁻¹ Inhibitor. Diese Konzentration wurde aufgrund von Vorversuchen gewählt und hemmt die Aktivität von Standardtrypsin zu 99%. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten für diese Eichkurven wurden dann wie oben unter 2.1.3 beschrieben durchgeführt und die Aktivität pro Zeiteinheit bestimmt. Die Eichung wurde in der beschriebenen Weise in zeitlichen Abstän-

² Gereinigtes Trypsin vom Hering wurde von der Universität Tromsø, Norwegen (K. Hjelmeland), zur Verfügung gestellt

den, besonders nach längeren Messpausen, mehrfach zur Kontrolle der Analysetechnik und des technischen Zustands des Fluoreszenzphotometers durchgeführt.

Die Linearitätsprüfung wurde mit geeigneten Verdünnungen aus dem oben bereits beschriebenen Trypsinstandard und Homogenaten von Heringslarven durchgeführt. Die Messung der enzymatischen Aktivität erfolgte wie oben unter 2.1.3 bereits beschrieben. Der Anstieg der Emission wurde bei diesen Proben über einen Zeitraum von mindestens 14 min. aufgezeichnet und die Linearität der Zunahme geprüft.

Für die Prüfung der Proportionalität wurden Sammelhomogenate (mehrere Larven in einem Homogenat) von jeweils mehreren Steinbutt-, Herings-, und Wolfsbarschlarven hergestellt. Von diesen Homogenaten wurden dann verschiedene Volumina in Abstufungen von 10 µl bis 300 µl mit jeweils 500 µl Substrat inkubiert. Das Gesamtvolumen in den Küvetten wurde, abweichend von der Beschreibung des Messverfahrens unter 2.1.3, diesmal mit TRIS-HCl-Puffer immer auf 800 µl eingestellt.

Die Eichung des analytischen Verfahrens und die Kontrolle des Fluoreszenzphotometers wurde mit zwei verschiedenen Trypsinen durchgeführt. Für die Eichung mit Standardtrypsin ist eine Messreihe exemplarisch in Abb. 8 dargestellt. Mit diesem Standardtrypsin zeigte die Eichkurve immer denselben gradlinigen Verlauf. Dieses Trypsin wurde während der gesamten Analysen zur ständigen technischen Kontrolle des Fluoreszenzphotometers verwendet. Die Zugabe von Trypsin-Inhibitor resultierte bei allen Konzentrationen in einer fast kompletten Hemmung der Aktivitäten. Dies zeigt, dass mit störenden Einflüssen, wie etwa einer photochemischen Spaltung des Substrates, unter den gewählten technischen Bedingungen nicht gerechnet werden muss.

Die Eichung mit gereinigtem Heringstrypsin ist in Abb. 9 dargestellt. Auch mit diesem Trypsin ist eine lineare Zunahme der Aktivität mit steigenden Konzentrationen zu beobachten. Unter Einfluss des Inhibitors zeigen sich hier etwas höhere Restaktivitäten, verursacht entweder durch eine andere trypsinähnliche Serin-Protease, deren Substratbindung durch den Inhibitor nicht behindert wurde (Asgeirsson et al. 1989), oder

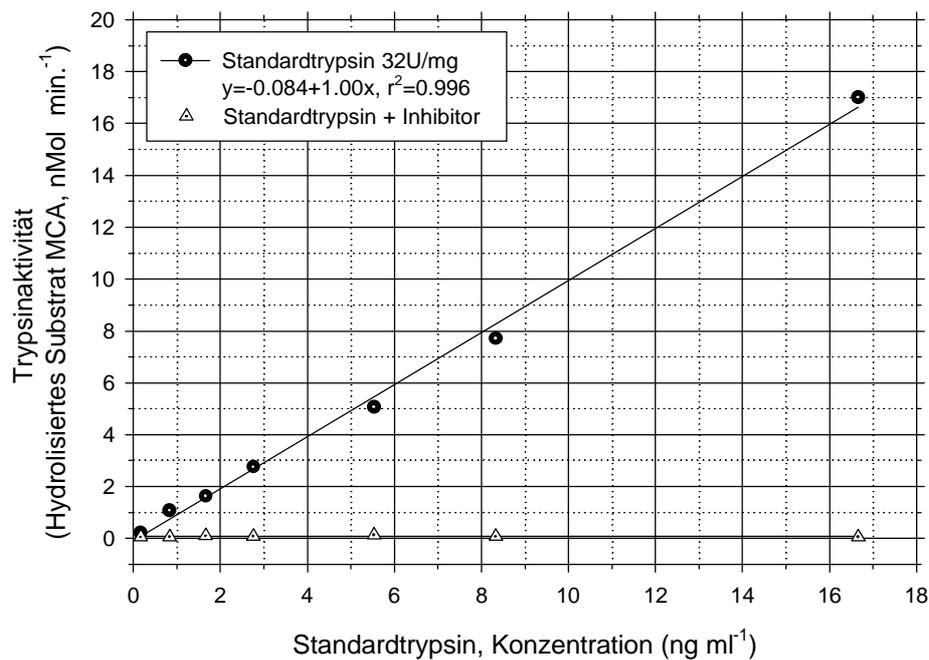


Abb. 8: Eichung mit Standardtrypsin (32U mg⁻¹, SERVA). Die Messpunkte repräsentieren jeweils Mittelwerte von 5 Parallelmessungen (die Standardabweichung ist nicht sichtbar, da sie vernachlässigbar klein ist). Die Werte sind signifikant an eine lineare Regressionsgerade angepasst ($p < 0.05$).

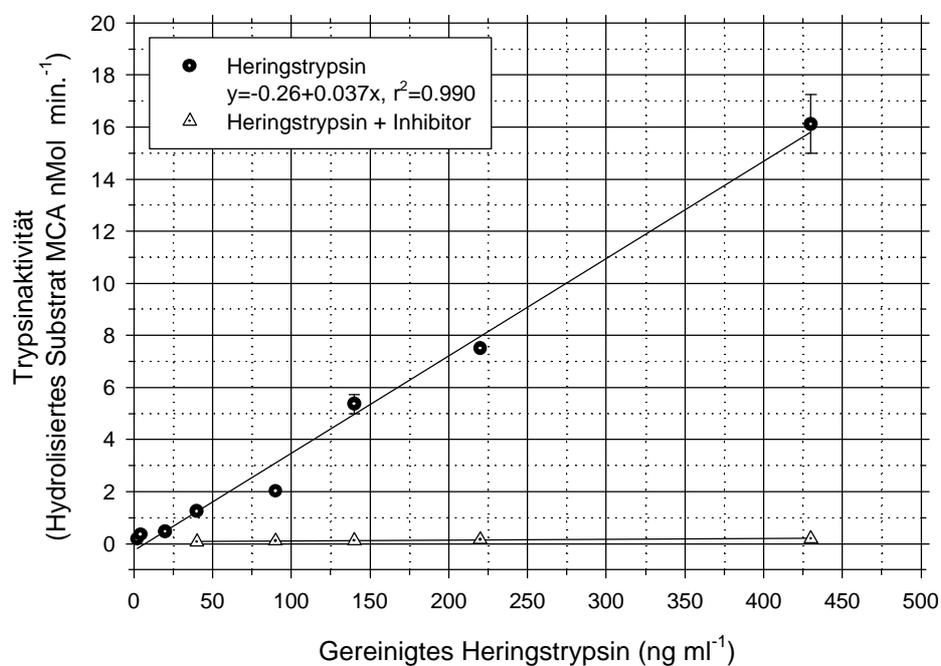


Abb. 9: Eichung mit gereinigtem Heringstrypsin. Die Messpunkte repräsentieren jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung von 3 Parallelmessungen. Die Werte sind signifikant an eine lineare Regressionsgerade angepasst ($p < 0.05$). Die flache Gerade zeigt die Restaktivitäten im Homogenat unter Einwirkung eines Trypsin-Inhibitors aus Hühnereiwiss.

durch eine "Verunreinigung" mit Chymotrypsin, das ebenfalls in der Lage ist, das Substrat CBZ-L-Arg-MCA in geringem Umfang zu hydrolysieren ohne von dem hier verwendeten, trypsinspezifischen Inhibitor quantitativ in seiner Aktivität gehemmt zu werden. Aus dieser Eichkurve kann auch die Trypsinaktivität in Heringslarven direkt quantifiziert werden.

Für die Linearitätsmessungen wurden 2 verschiedene Konzentrationen von der Standardtrypsinlösung (8.3 ng ml^{-1} und 5.5 ng ml^{-1}) inkubiert und die Emissionsänderung über einen Zeitraum von 16 min. alle 2 min. gemessen. Die Abb. 10 zeigt einen signifikant ($p < 0.05$) linearen Verlauf für beide Konzentrationen.

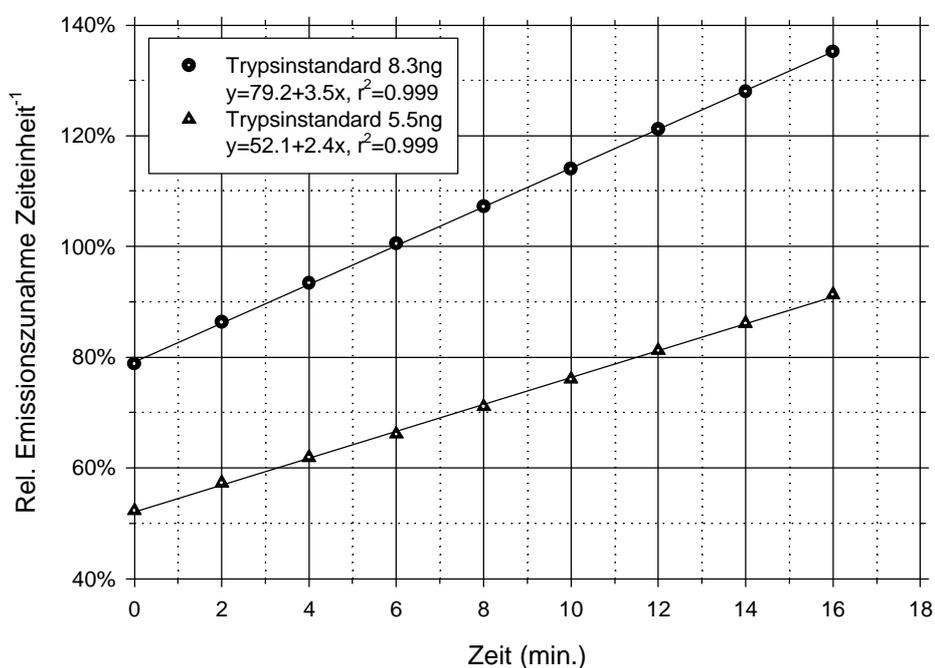


Abb. 10: Zunahme der Emission pro Zeiteinheit für zwei verschiedene Konzentrationen vom Standardtrypsin (8.3 und 5.5 ng ml^{-1}) über eine gesamte Messzeit von 16 min. Die Messpunkte wurden an eine lineare Regression angepasst. Die Fluoreszenzzunahme ist signifikant linear zur Zeit korreliert ($p < 0.05$).

Zur Prüfung der Beziehung zwischen der Aktivität und der Emissionszunahme pro Zeiteinheit für Trypsin aus Fischlarven unter den gegebenen Bedingungen wurden exemplarisch zwei verschiedene Heringslarvenhomogenate verwendet. Auch in diesem Fall ist eine lineare Zunahme der Emission pro Zeiteinheit zu beobachten (Abb. 11).

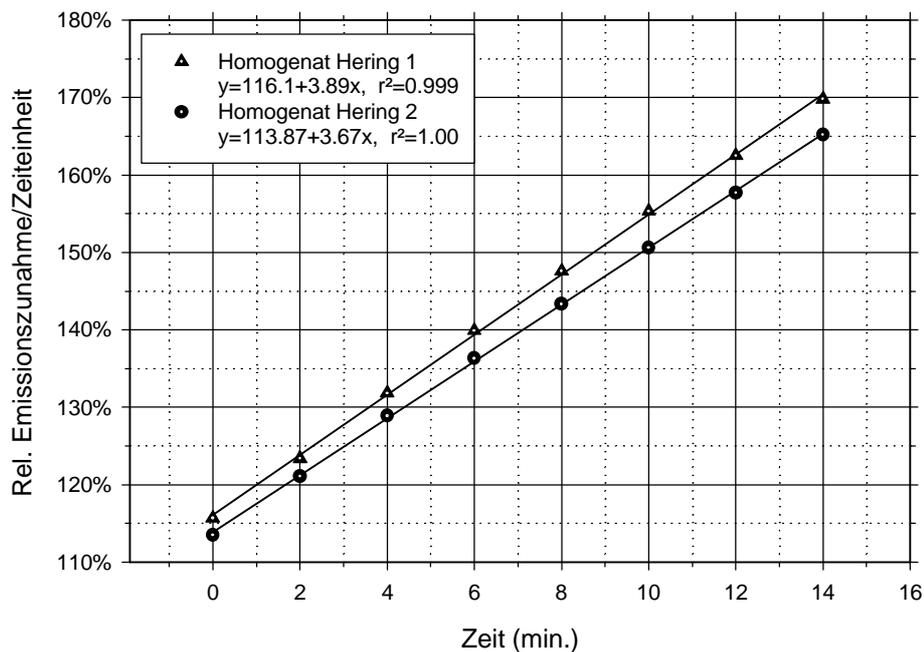


Abb. 11: Zunahme der Emission pro Zeiteinheit für Trypsin aus zwei verschiedene Heringslarven über einen Messzeitraum von 14 min. Die Messpunkte wurden an eine lineare Regression angepasst. Die Fluoreszenzzunahme ist signifikant linear mit der Zeit korreliert ($p < 0.05$).

Die Proportionalität des fluorimetrischen Messverfahrens wurde mit Homogenaten von Steinbutt-, Herings-, und Wolfsbarschlarven geprüft. Es wurde angenommen, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der zur Messung eingesetzten Homogenatmenge (gleichbedeutend mit der Trypsinkonzentration) und der Emissionszunahme besteht.

Beim Steinbutthomogenat wurde auch bei einer 30fach höheren Konzentration im Vergleich zum kleinsten Volumen keine signifikante Abweichung vom linearen Verlauf gefunden (Abb. 12).

Mit Heringslarvenhomogenat wurde im Volumenbereich von 10-150 μl , mit Homogenat von Wolfsbarschlarven im Volumenbereich von 10-100 μl gemessen und in beiden Fällen ebenfalls ein lineares Verhältnis zwischen Aktivität (ausgedrückt als hydrolysiertes Substrat min.^{-1}) und eingesetztem Volumen gefunden (Abb. 13).

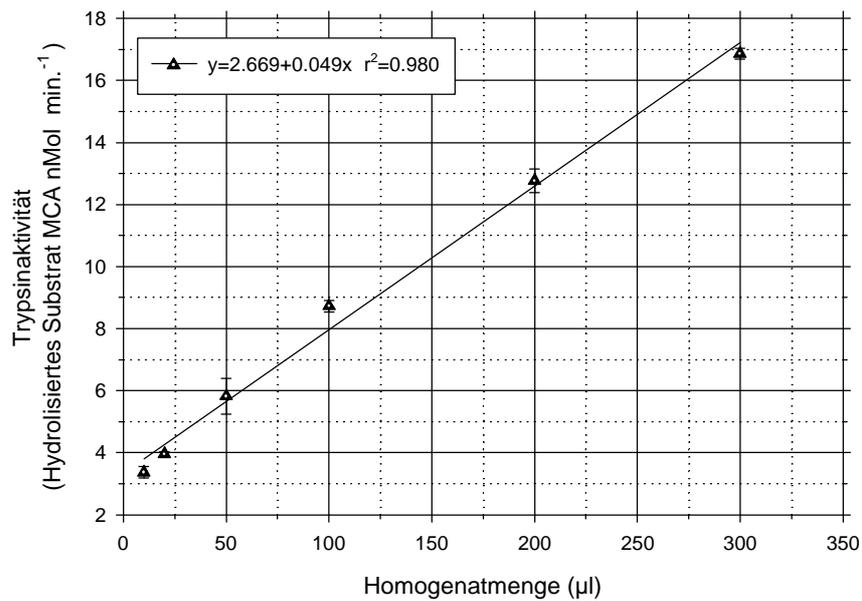


Abb. 12: Proportionalitätsmessung mit Steinbutthomogenat für Volumina von 10-300 µl pro Messung. Substrat CBZ-L-Arg-MCA. Die Messwerte sind jeweils Mittelwerte von 3 Parallelmessungen. Die Homogenatmengen sind linear proportional zur enzymatischen Aktivität. Die angepasste Regressionsgerade zeigt einen signifikant linearen Verlauf ($p < 0.05$).

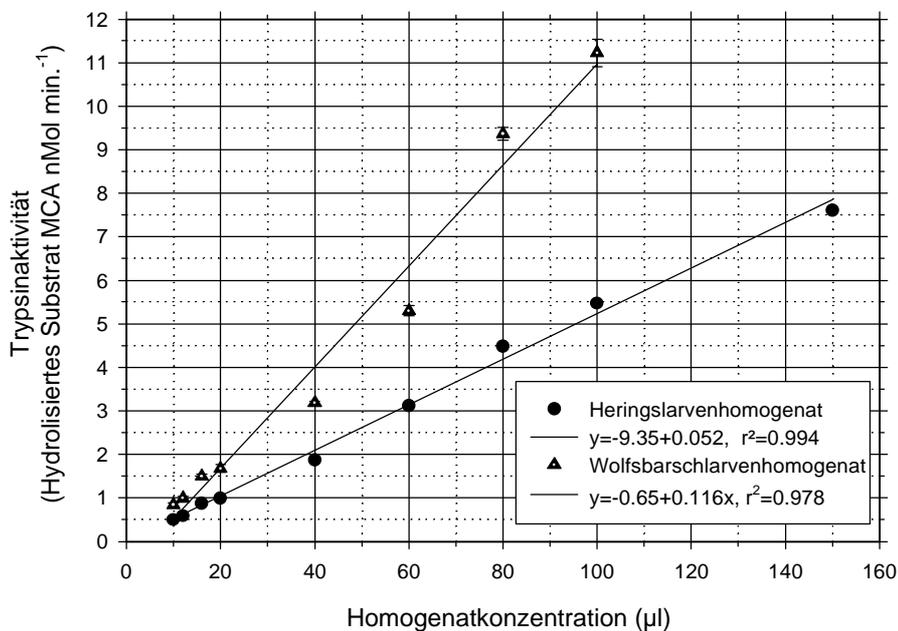


Abb. 13: Proportionalitätsmessung mit Herings- und Wolfsbarschlarvenhomogenat für Volumina von 10- 150 µl bzw. 10-100 µl pro Messung. Substrat CBZ-L-Arg-MCA. Die Messwerte sind jeweils Mittelwerte von 3 Parallelmessungen. Die Homogenatmengen sind linear proportional zur enzymatischen Aktivität. Die angepassten Regressionsgeraden zeigen einen signifikant linearen Verlauf ($p < 0.05$).

2.1.5 Quantifizierung der Trypsinaktivität

Als Mass zur Quantifizierung der katalytischen Aktivität von Enzymen dient die Geschwindigkeit der katalysierten Reaktion, also des Substrat-Umsatzes bzw. der Produktbildung pro Zeiteinheit. In dieser Arbeit wird die Konzentration des aus dem Substrat durch enzymatische Aktivität freigesetzten Fluorophors 4-methylcoumarinyl-7-amid aus dem Substrat N α -carbobenzoxy-L-arginin-4-methylcoumarinyl-7-amid als Mass für die Trypsinaktivität im Larvenhomogenat verwendet (siehe auch Abb. 6).

Primär verursacht die Freisetzung des Fluorophors durch enzymatische Hydrolyse des Substrates einen Anstieg der relativen Fluoreszenz in der Probe. Um diese Änderung in der Fluoreszenz pro Zeiteinheit quantifizieren zu können, wurde eine Eichkurve mit dem reinen, bei der Hydrolyse entstehenden Produkts 4-methylcoumarinyl-7-amid erstellt (Abb. 14). Da dieses Amid, wie auch das Substrat selber, nicht wasserlöslich ist, wurden 0.5 mg des Amids zunächst in 100 μ l DMSO aufgelöst und dann mit TRIS-HCl Puffer eine 2.7×10^{-6} molare Stammlösung hergestellt. Für die Eichkurve wurde die Fluoreszenz für Konzentrationen von 4.8 – 400 nMol unter den gleichen Bedingungen wie die Enzymaktivität in den Larvenproben gemessen (600 μ l Inkubationsvolumen, pH 8.00, 30°C, Excitation 380 nm, Emission 440 nm).

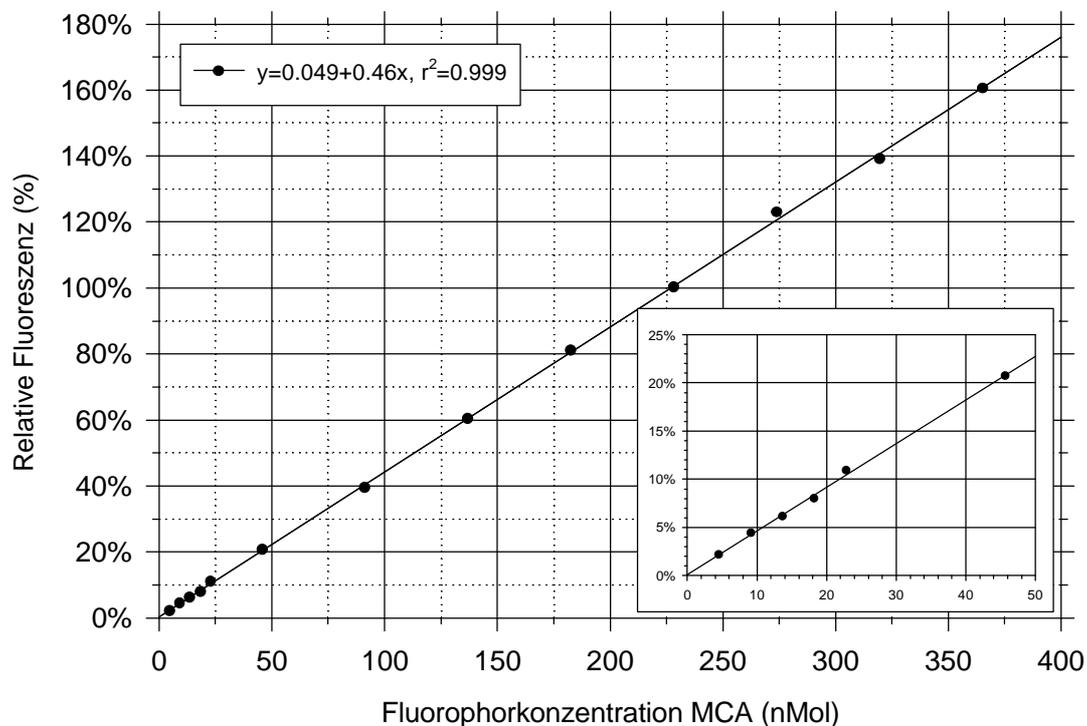


Abb. 14: Eichkurve mit dem Fluorophor MCA im Konzentrationsbereich von 4.5-365 nMol. An die Messwerte wurde eine signifikant lineare Regression angepasst ($p < 0.05$). Der Ausschnitt zeigt den Bereich der in der Größenordnung der Konzentrationen liegt, der den Trypsinaktivitäten entspricht, wie sie bei den meisten Messungen in dieser Arbeit an Fischlarven festgestellt wurden (die Einheiten der Achsen sind identisch mit denen der grossen Abbildung).

Die Messwerte wurden an eine lineare Regression angepasst und die daraus errechnete Regressionsgeradengleichung zur Umrechnung der Trypsinaktivität in die Menge hydrolysierten Substrates CBZ-L-Arg-MCA Zeiteinheit⁻¹ verwendet

Entsprechend der theoretischen Annahme, dass bei einer Nullkonzentration des Fluorophors keine Fluoreszenz gemessen werden kann, wurde die Abweichung vom Schnittpunkt der Eichgeraden mit dem Nullpunkt (erster Term der Geradengleichung: 0.049) bei der Berechnung der hydrolysierten Substratkonzentration aus der Trypsinaktivität vernachlässigt.

Unter Verwendung dieser Eichkurve wird die Trypsinaktivität in dieser Arbeit einheitlich als hydrolysiertes Substrat MCA in nMol min.⁻¹ angegeben.

2.1.6 Verluste von Enzymaktivität im Larvenhomogenat

In diesen Versuchen sollte geprüft werden, ob mit Verlusten von enzymatischer Aktivität während der Präparation des Larvenhomogenats bis zur Messung gerechnet werden muss. Solche Verluste können z.B. durch das Sedimentieren von Trypsin beim Zentrifugieren oder biochemisch durch den Einfluss von Inhibitoren im Homogenat (Hjelmeland 1983) entstehen. Dazu wurden einige Sammelhomogenate von 16 Tage alten Steinbutt- und 46 Tage alten Heringslarven sowie einiger Heringslarven aus einer Feldprobe (Schlei) erst homogenisiert und dann zwei Aliquots gebildet. Ein Aliquot wurde mit verschiedenen, aber bekannten Konzentrationen eines Standardtrypsins (lyophilisiertes Trypsin aus Rinderpancreas, SERVA, 32U/mg) versetzt ("gespikt"). Alle Proben wurden dann während der weiteren Präparation identisch behandelt. Anschliessend wurden Aktivitätsmessungen mit A) den reinen Larvenhomogenaten, B) den 7 "gespikten" Aliquots und C) dem Trypsinstandard (7 Konzentrationen, entsprechend den 7 Konzentrationen der "Spikeproben") durchgeführt. Abb. 15 gibt einen schematischen Überblick über die praktische Durchführung dieses Versuchs.

2.1.7 Einfluss der Zentrifugationsgeschwindigkeit

Der Einfluss der Zentrifugationskräfte auf die Enzymaktivitätsausbeute im Homogenat wurde bei 3 verschiedenen g-Kräften geprüft. Diese Untersuchung ergänzt die Ergebnisse aus dem vorangegangenen Abschnitt 2.1.6. Damit sollte geprüft werden, ob und bei welchen g-Zahlen bei der Zentrifugation der Proben Verluste von Trypsinaktivität entstehen können. Aktivitätsverluste können durch die Anhaftung von Enzymmolekülen an Zelltrümmern entstehen, welche bei der Zentrifugation aus dem Überstand entfernt werden sollen (Pelletier et al. 1994). Dazu wurden Homogenate von 20 Heringslarven verschiedenen Alters aus der Aufzucht in ausreichender Menge hergestellt, so dass von jeder Larve genügend Homogenat für 3 Aktivitätsmessungen zur Verfügung standen. Die Homogenate wurden dann dreimal mit unterschiedlichen Umdrehungszahlen, entsprechend unterschiedlichen g-Kräften, jeweils 60min. zentrifugiert ($1000\text{U min}^{-1} \cong 685 \times g$, $3000\text{U min}^{-1} \cong 2055 \times g$ und $6000\text{U min}^{-1} \cong 4110 \times g$). Nach jeweils einem Durchgang wurde die enzymatische Aktivität sofort nach dem unter 2.1.3 beschriebenen Verfahren bestimmt. Dieser Versuch wurde nur

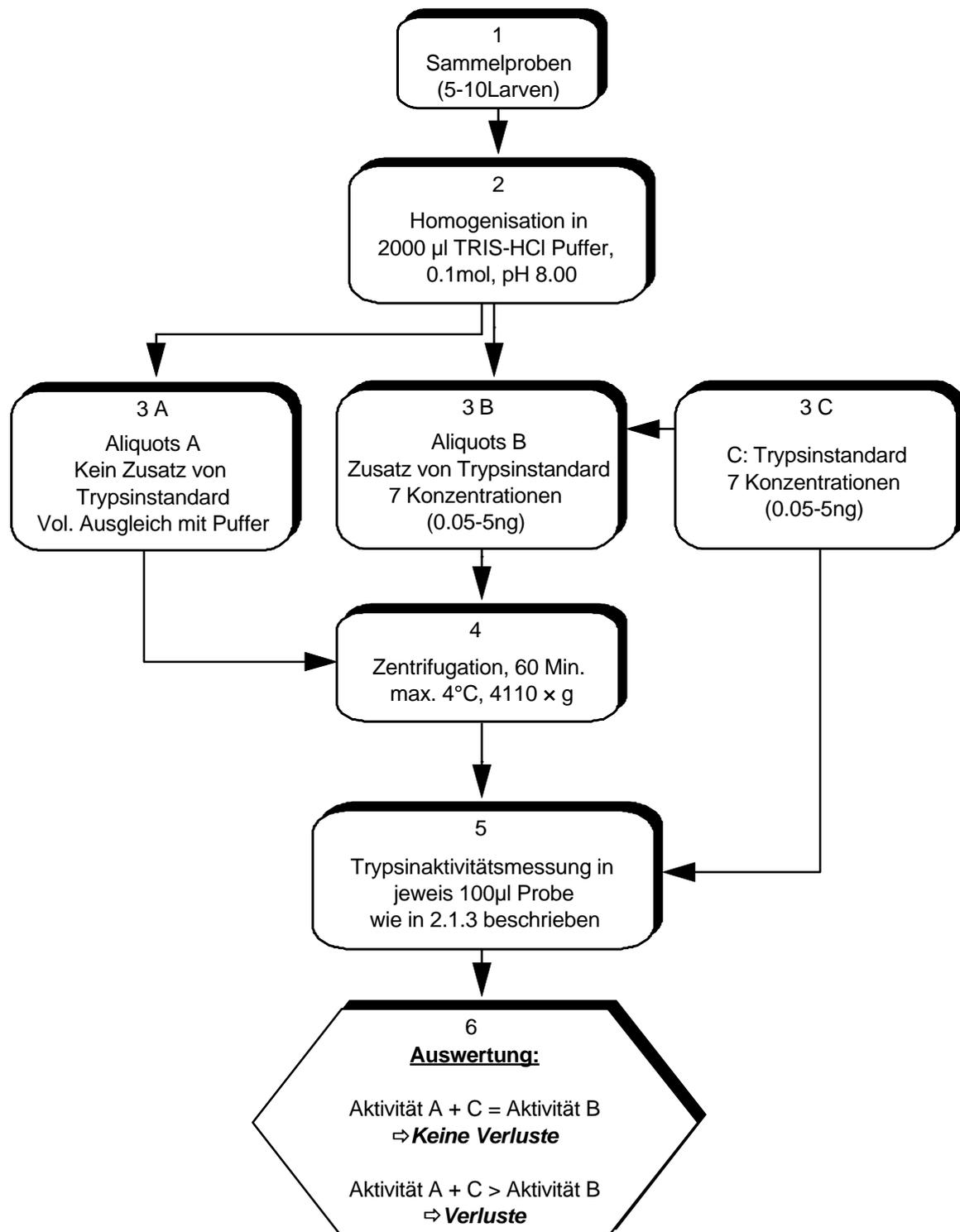


Abb. 15: Flussdiagramm zum methodischen Ablauf bei der Bestimmung der Verluste von enzymatischer Aktivität bei der Präparation der Fischlarvenhomogenate

einmal mit Heringslarven durchgeführt, da davon ausgegangen werden kann, dass sich alle Gewebehomogenate aus Fischlarven unter diesem Aspekt identisch verhalten. Die Abb. 16 vergleicht die resultierenden Aktivitäten für alle 3 Behandlungen.

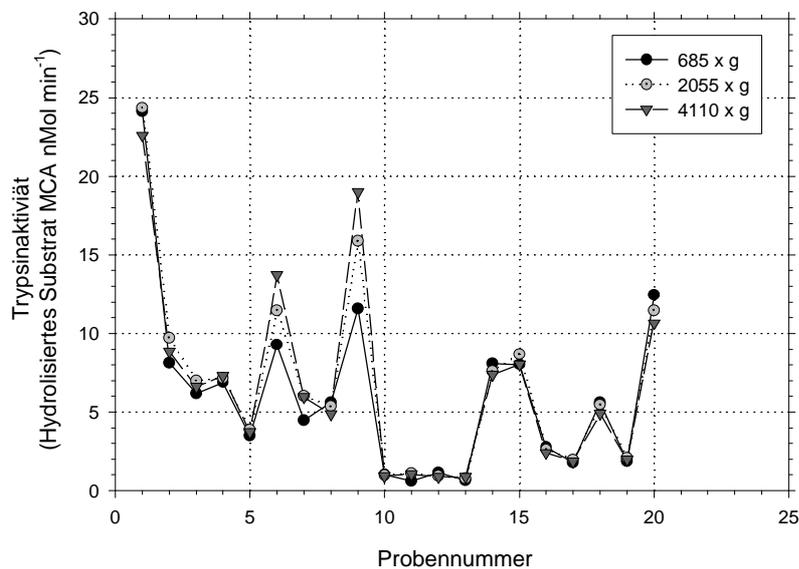


Abb. 16: Der Einfluss von 3 verschiedenen g-Beschleunigungen bei der Zentrifugation der Fischlarvenhomogenate auf die Ausbeute an enzymatischer Aktivität.

Die Aktivität zeigt bei einigen Proben Unterschiede in Abhängigkeit von der g-Beschleunigung die aber im einzelnen nicht erklärt werden können. Die Messwerte von Homogenaten die mit der höchsten g-Beschleunigung behandelt wurden, zeigen in einigen Proben höhere Aktivitäten. In diesen Fällen können bei den Proben, die mit der geringeren g-Beschleunigung behandelt wurden, noch vermehrt Zelltrümmer im Überstand vorhanden gewesen sein, was zu einem Quenching-Effekt (Verunreinigungen, die zur Fluoreszenzminderung durch Selbstabsorption von Energie führen, Udenfried 1969) und damit zu einer geringeren Fluoreszenzausbeute führen kann. Auf der Basis dieser Ergebnisse erwies sich die höchste g-Stufe als nicht nachteilig für die Aktivitätsausbeute bei die Messung und deshalb wurden alle Fischlarvenhomogenate bei 4110 x g zentrifugiert.

2.1.8 Enzymkinetik: Substratkonzentration und Substrataffinität,

Die *Michaelis-Menten* Gleichung (1913) sagt eine hyperbolische Abhängigkeit zwischen der Umsatzgeschwindigkeit und der Substratkonzentration voraus. Mit steigender Konzentration wird die Geschwindigkeit der Reaktion grösser, bis sie sich einem Grenzwert nähert. Für die in dieser Arbeit vorgestellte Messmethode wurde die optimale Substanzkonzentration des Substrates CBZ-L-Arg-MCA auf empirische Weise ermittelt. Dazu wurden feste Konzentrationen vom Standardtrypsin (8.3ng ml^{-1}) und von Herings- und Steinbutthomogenaten mit ansteigenden Substratkonzentrationen inkubiert und die Geschwindigkeit des Substratum-

satzes gemessen. Aus den Ergebnissen wurde dann die optimale Substratkonzentration für die maximale Geschwindigkeit der Reaktion ermittelt. Aus der Darstellung dieser Ergebnisse als *Lineweaver-Burk-Plot* lässt sich erkennen, ob beispielsweise ein Substratüberschuss vorliegt, der zu einer Substrathemmung führen kann, was die Brauchbarkeit und Vergleichbarkeit der Enzymaktivitätsmessungen einschränken würde.

Trypsin unterschiedlicher Herkunft kann ganz unterschiedliche enzymkinetische Eigenschaften in Beziehung zum jeweils verwendeten Substrat zeigen (Hjelmeland 1995). Deshalb wurden exemplarisch für Standard-, Herings- und Steinbuttlarventrypsin aus den Messungen zur Feststellung der Substratkonzentration charakteristische Kenngrößen für Enzyme wie die *Michaelis-Konstante* K_m und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} abgeleitet und verglichen. Dieser Vergleich soll zeigen, ob sich die Trypsine aus den Larven der verschiedenen Fischarten in ihren enzymkinetischen Eigenschaften, in der Affinität zum Substrat und in der Effizienz der Substratumsetzung, unterscheiden. In diesem Vergleich wurde auch das Standardtrypsin aus Rinderpankreas mit einbezogen, da es regelmässig zur Kontrolle der Konstanz des Messverfahrens verwendet wurde.

2.1.9 Temperatur-, pH-Optimum und Temperaturresistenz

Alle Enzym-katalysierten Reaktionen sind empfindlich gegenüber Temperaturänderungen. Der Temperaturkoeffizient der Reaktionsgeschwindigkeit beträgt bei einer Temperaturänderung um 1°C bis zu 10% (Bergmeyer 1977). Daraus lässt sich ableiten, dass mit ansteigender Temperatur auch die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Enzym und Substrat ansteigt und sich die Produktbildung pro Zeiteinheit steigern lässt. So lassen sich zur Steigerung der Effizienz der Methode vor allem kürzere Messzeiten durch Erhöhung der Temperatur erreichen. Enzyme gehören aber zur Stoffklasse der Proteine, deshalb ist eine beliebige Steigerung der Temperatur nicht möglich, da ab einer bestimmten Temperatur Denaturierungseffekte einsetzen, die den gegenteiligen Effekt bewirken können. Das Temperaturoptimum ergibt sich aus der Überlagerung zweier Vorgänge: 1. Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit durch Ansteigen der kinetischen Energie. 2. Abnahme der Enzymaktivität durch zunehmende Denaturierung. Praktisch wird die Temperaturresistenz eines Enzyms getestet, indem vor der eigentlichen Aktivitätsmessung eine Vorinkubation bei verschiedenen Temperaturen vorgenommen wird. Für Trypsin in Fischlarvenhomogenaten ergab sich in früheren Untersuchungen zur Temperaturresistenz, dass deutliche Denaturierungserscheinungen erst oberhalb von 45°C eintreten (Ueberschär 1985).

Als weiterer wichtiger Aspekt bei der Bestimmung von Enzymaktivitäten ist die pH-Abhängigkeit der Reaktion zu berücksichtigen. Jedes Enzym hat ein charakteristisches, pH-abhängiges Aktivitätsmaximum, das in der Regel sehr schmalbandig ist. In dieser Arbeit wurden deshalb geeignete Versuche zur Ermittlung des Temperatur- und pH-Optimums von Fischlarventrypsin durchgeführt. Dazu wurden konstante Enzymkonzentrationen (Standardtrypsin und Homogenate von Heringslarven) mit Substratlösungen von CBZ-L-Arg-MCA

(0.2 mMol) inkubiert, bei denen der pH-Wert des TRIS-Puffers mit HCl auf Werte zwischen pH 6 und pH 10 eingestellt war. Die Aktivität der jeweiligen Kombinationen wurde wie unter 2.1.3 beschrieben gemessen. Da es sich bei dem Trypsin in den Fischlarvenhomogenaten um eine alkalische Protease handelt (Lehninger 1977, Hjelmeland 1995) und aus früheren Untersuchungen bekannt war, dass die Aktivität des Trypsins in Fischlarvenhomogenaten in saurer Lösung nur minimal aktiv ist (Ueberschär 1985), wurde hier auf Messungen bei pH-Werten unter 6 verzichtet.

Ein ebenfalls wichtiges Kriterium für die Reproduzierbarkeit der hier vorgestellten Methode ist die Stabilität des Substrates CBZ-L-Arg-MCA in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert. Eine Kombination aus pH-Wert und Temperatur, die einerseits optimale Reaktionsbedingungen für das zu messende Enzym darstellt, andererseits aber zur Instabilität des Substrates (Autohydrolyse) führt, ist nicht sinnvoll. Fluoreszierende Substrate verhalten sich nach eigenen Studien dabei empfindlicher als konventionelle chromogene Substrate. Bei den Versuchen zum Temperatur- und pH-Optimum der enzymatischen Reaktion des Trypsins wurde deshalb auch das Verhalten des Substrates CBZ-L-Arg-MCA unter den verschiedenen Bedingungen beobachtet.

2.1.10 Interkalibrierung

Durch eine Kooperation mit dem Marine Biological Laboratory in Helsingør, Dänemark, und der Universität Tromsø, Norwegen, konnte der in dieser Arbeit entwickelte Enzymaktivitätsassay für Trypsin mit einem Radioimmunoassay zur direkten quantitativen Bestimmung von Trypsin verglichen werden. Einzelheiten zu diesem Vergleich sind bei Ueberschär et al. (1992) beschrieben. Da die Ergebnisse aus diesem Vergleich einen wichtigen Beitrag zur Bewertung des in dieser Arbeit angewandten Enzymaktivitätsassays darstellen, werden sie in Auszügen im Ergebnisteil gezeigt und diskutiert.

2.1.11 Faktorberechnung

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, aus den vorliegenden Ergebnissen für die im Labor kalibrierten Arten eine allgemeingültige Aussage über das quantitative Verhältnis des Indikators Trypsin zwischen gefütterten und hungernden Fischlarven abzuleiten. Unter der Annahme, dass dieses Verhältnis für die kalibrierten Arten nicht signifikant unterschiedlich ist, wäre die Voraussetzung für die Berechnung eines Faktors vorhanden, mit dem es dann möglich ist, auch den Ernährungszustand von Fischlarven aus Felduntersuchungen beurteilen und quantifizieren zu können, für die noch keine Laborkalibrierung vorliegt. Bei den insgesamt 6 kalibrierten Arten wurden die Verhältnisse zwischen gefütterten und hungernden im Labor aufgezogenen Fischlarven längenbezogen berechnet. Aus den Faktoren für gefütterte und hungernde Dorsch- Goldbrassen- Sardinien- und Wolfsbarschlarven (die Verhältnisse für Herings- und Steinbuttlarven wurden nicht berücksichtigt, weil diese sich deutlich von den anderen 4 Verhältnissen unterschieden) wurde dann ein Mittelwert berechnet. Zur Abschätzung hungernder Larven wird postuliert, dass bei Larven aus einer

Feldprobe mindestens der jeweils niedrigste Trypsinaktivitätswert einer hungernden Larve entspricht. Der Aktivitätswert dieser Larve kann mit dem Faktor multipliziert werden und so ein oberer, längenbezogener Grenzwert für die Quantifizierung des Anteils hungernder Larven berechnet werden. Alle Larven mit einem individuell höheren Wert könnten dann als "nicht hungernd" klassifiziert werden.

2.1.12 Methodenoptimierung

Während der Durchführung der Routinemessungen für diese Arbeit gab es einige Entwicklungen im Bereich der fluoreszierenden Substrate und des technischen Zubehörs für die Fluoreszenzphotometrie. Da nach der Etablierung der Routinemethode eine Änderung des Messverfahrens zur Trypsinaktivität nicht mehr möglich war, um die Vergleichbarkeit von Ergebnissen nicht in Frage zu stellen, konnten die neueren Entwicklungen zur Steigerung der Empfindlichkeit der Analytik noch nicht angewendet werden. Es wurden aber einige Versuche mit einem Substrat durchgeführt, das noch empfindlicher auf das Trypsin in Fischlarvenhomogenaten zu reagieren scheint. Dabei handelt es sich um ein weiteres Derivat vom L-arginin-4-methylcoumarinyl-7-amid (N α -Benzoyl-L-arginin-4-methylcoumarinyl-7-amid, BZ-L-Arg-MCA).

Eine technische Verbesserung wurde mit zweiseitig verspiegelten Halbmikroküvetten erreicht (HELLMA, Typ 104FR-QS, 10 mm Schichtdicke). Durch die Rückstrahlung von sonst nicht genutzter Fluoreszenz zum Detektor konnte eine Empfindlichkeitssteigerung ohne Veränderung der Substratzusammensetzung oder Volumina um den Faktor 2-3 erreicht werden.

Da die Optimierungsmöglichkeiten in künftigen Trypsinaktivitätsmessungen berücksichtigt werden sollten, werden einige exemplarische Ergebnisse zu diesen empfindlichkeitsteigernden Experimenten vorgestellt.

Trypsinogenaktivierung

Mit der vorhandenen Analytik kann in Fischlarvenhomogenaten prinzipiell auch die inaktive Vorstufe des Trypsins, das Trypsinogen, gemessen werden. Damit kann die Aussagekraft der Trypsinaktivitätsmessung um verschiedene Aspekte erweitert werden, so kann z.B. die Dauer einer Hungerperiode quantifiziert werden. Dazu wurden in dieser Arbeit einige exemplarische Experimente mit Trypsinogenstandard und Enterokinase durchgeführt (Glazer & Steer 1977). Jeweils 100 μ l aus einer Trypsinogenlösung (10ng ml⁻¹) wurden mit verschiedenen Enterokinasekonzentrationen (16,5 μ g ml⁻¹ - 148.5 μ g ml⁻¹) mit dem Substrat CBZ-L-Arg-MCA (0.2 mMol) inkubiert wie unter 2.1.3 beschrieben (pH 8.00, 30°C) und die Zunahme der Aktivierung des Trypsinogens beobachtet. Auf diesem Weg kann in 2 Stufen erst die Aktivität von Trypsin bestimmt werden und dann im zweiten Schritt nach Aktivierung mit Enterokinase der Trypsinogenanteil:

$$\text{Trypsinogenanteil}_{\text{aktiviert}} = \text{Gesamtaktivität} - \text{Trypsinaktivität}$$

2.2 Laborexperimente mit Fischlarven

2.2.1. Auswahl der Fischarten

Für die Entwicklung der fluoreszenzphotometrischen Methodik, für die Basismessungen und für ausgedehntere Kalibrierungen wurden Larven von Fischarten ausgewählt, die einerseits zuverlässig über einen längeren Zeitraum in grosser Anzahl zur Verfügung standen, deren Aufzucht erprobt und relativ problemlos durchzuführen war und die sich ausserdem in ihrer Entwicklungsphysiologie unterscheiden, so dass die Entwicklung der Methodik und die Kalibrierung des Indikators nicht nur für einige spezielle Arten Gültigkeit haben.

Die Wahl fiel auf die Arten Hering (*Clupea harengus*) und Steinbutt (*Scophthalmus maximus*). Laichende Ostseeheringe konnten aus der Kieler Innenförde und aus dem Nord-Ostsee-Kanal entnommen werden. Die Kooperation mit einem professionellen Aquakulturbetrieb (Firma BUTT, Bülk bei Kiel) sicherte die Beschaffung von Gameten des Steinbutts über einen ausgedehnten Zeitraum, so dass wie beim Hering mehrere Aufzuchten durchgeführt werden konnten.

In Vorversuchen zur Trypsinaktivität bei gefütterten und hungernden Fischlarven wurde deutlich, dass es charakteristische Eigenarten bei der Enzymaktivität in Abhängigkeit von Art und Umgebungsvariablen geben kann. Deshalb wurden weitere Arten in die Kalibrierung mit einbezogen. Daten von folgenden Arten konnten durch die Mitarbeit in verschiedenen Projekten und internationalen Kooperationen berücksichtigt werden: Dorsch (*Gadus morhua*) und Wolfsbarschlarven (*Dicentrarchus labrax*) konnten durch Unterstützung der Firma BUTT in deren Versuchsanlagen aufgezogen und kalibriert werden. Goldbrassenlarven (*Sparus aurata*) wurden in Zusammenarbeit mit einer griechischen Aquakulturanlage (Vasni-Fishfarms, Molos, Fthiotidos) aufgezogen. Im Rahmen einer Kooperation mit brasilianischen Wissenschaftlern wurden Larven der brasilianischen Sardine (*Sardinella brasiliensis*) in einer meeresbiologischen Aussenstation der Universität São Paulo (Base do Norte, Ubatuba) aufgezogen.

Dieses breite Spektrum an Kalibrierungsdaten von Fischarten mit Unterschieden in der Larvalentwicklung und zudem aus ganz unterschiedlichen abiotischen Verhältnissen erhöht den praktischen Wert der hier entwickelten Methodik zur Bestimmung des Ernährungszustandes von Fischlarven erheblich. Eine möglichst breite Basis an Kalibrierungsdaten erlaubt erst eine allgemeingültige Aussage über die Unterschiede der Enzymaktivitäten bei hungernden und gefütterten Larven. Für die im Institut für Meereskunde (IfM) durchgeführten Larvenaufzuchten (z.B. Hering und Steinbutt) wird im folgenden Teil eine Beschreibung aller relevanten Daten, Fakten, Parameter und Bedingungen gegeben. Bei der Beteiligung an Larvenaufzuchten, deren eigentlicher Zweck nicht die Kalibrierung war (Dorsch, Wolfsbarsch, Goldbrasse), wird in der Methodenbeschreibung auf einige Details verzichtet.

2.2.2 Laboraufzucht, Gametengewinnung, Inkubation und Aufzucht

2.2.2.1 Hering (*Clupea harengus* L.)

Für den ersten Erbrütungsansatz im Frühjahr 1986 wurden am 06.05.86 laichreife Heringe aus Bundgarnfängen aus dem Nord-Ostsee-Kanal verwendet. Diese Fangmethode hat den Vorteil, dass frischtote Heringe zur Verfügung stehen und so maximale Befruchtungserfolge erzielt werden können. Die Gewinnung der Gameten und die Befruchtung wurden direkt am Fangort an Bord der Forschungsbarkasse "Littorina" durchgeführt. Dazu wurden 10 Glasplatten (ca. 17x17cm) als "Laichsubstrat" auf dem Boden einer etwa 50 Liter fassenden Kunststoffwanne, die mit Kanalwasser gefüllt war, ausgelegt. Die Heringseier wurden dann so abgestreift, dass sie in einer möglichst einschichtigen Lage auf den Glasplatten haften konnten. Das Heringssperma wurde zunächst in Bechergläsern aufgefangen, mit Kanalwasser verdünnt und anschliessend in die Kunststoffwanne gegossen. Nach eigenen Studien und Versuchen von Bahrs (1981) ist nach ca. 10 Minuten ein Befruchtungserfolg von 100% erreicht. Nach dieser Zeitspanne wurde das Wasser in der Kunststoffwanne sukzessive ausgetauscht. Unter ständiger leichter Spülung mit Kanalwasser wurden die belegten Glasplatten in das Labor im IfM überführt. Im Unterschied zu diesem Verfahren wurden die Heringe bei dem Versuchsdurchgang 1989 auf Eis gelagert erst in das Labor transportiert, da die Forschungsbarkasse nicht zur Verfügung stand. Der Befruchtungsvorgang und die nachfolgende Behandlung wurden dann genau wie oben beschrieben durchgeführt. Ein Nachteil für den Erbrütungserfolg ergab sich daraus nicht. Der Befruchtungserfolg lag in beiden Ansätzen bei etwa 95%.

Inkubation der befruchteten Eier

Für die Erbrütung wurden die Glasplatten in einem 35l-Plexiglasaquarium senkrecht aufgestellt und eine gleichmässige Belüftung der Glasplatten von unten ermöglicht. Das Plexiglasbecken wurde mit Ostseewasser aus dem Kreislauf des Schauaquariums des IfM gefüllt (Salinität 15 psu bei der Aufzucht 1986) bzw. bei der Aufzucht 1989 direkt der Versorgungsleitung mit Ostseewasser entnommen (15 – 16 psu). Das Wasser in den Becken wurde täglich einmal gewechselt, um eine bakterielle Anreicherung und die Gefahr der Verpilzung zu verringern. Das hierfür verwendete Wasser wurde vorher einer UV-Bestrahlung (UV-Strahlungskörper im Durchlauf, 30 Watt, Firma Wiegandt) unterzogen, über Gaze mit einer Porenweite von 50µm filtriert und der Inkubationstemperatur angeglichen. Die Plexiglasbecken wurden jeweils in einem temperaturkonstanten Raum bei 10°C aufgestellt. Die Becken wurden einem 9 Stunden Hell-/15 Stunden Dunkelrhythmus (1986) bzw. einer Dauerbeleuchtung (1989) ausgesetzt. Bei der Aufzucht 1989 wurde kurz vor dem erwarteten Schlupftermin auf denselben Beleuchtungsrhythmus wie bei der Aufzucht 1986 umgestellt, da der Schlupfvorgang durch Dauerlicht gehemmt wird (Alderdice & Velsen 1971). Die Ei-entwicklung wurde an Eiern, die beim Befruchtungsvorgang separat auf Petrischalen aufgebracht worden waren und ebenfalls in den Erbrütungsbecken untergebracht waren, täglich kontrolliert.

Bis zum Schlüpfen der ersten Larven vergingen 1986 10 Tage, wobei massenhaftes Schlüpfen aber erst am 12. Tag beobachtet wurde. Während der Erbrütung der Eier für die Aufzucht 1989 wurde durch eine geringere Inkubationstemperatur (im Mittel 9.2°C) eine Verlängerung der Entwicklungszeit erreicht. Der Schlupf der ersten Larven fand am 12. Tag statt, der Massenschlupf wurde am 15. Inkubationstag beobachtet.

Um den Erbrütungserfolg zu quantifizieren, wurden auf einer definierten Fläche auf den Glasplatten am Ende der Schlupfphase leere Eihüllen, abgestorbene oder nicht befruchtete Eier gezählt. Daraus ergab sich ein Schlupferfolg von 75%, vergleichbar mit den Ergebnissen einer Arbeit von Blaxter & Hempel (1961) über die Aufzucht von Heringsbrut, und deckte sich mit eigenen Ergebnissen (Ueberschär 1985).

Larvenhaltung

Nach dem Schlupf wurden die Heringslarven in eine für die Versuche aufgebaute Aufzuchtanlage umgesetzt (Abb. 17). Die Anlage bestand aus vier je 400l und neun je 75l fassende Becken, aus glasfaserverstärktem, dunkelgrün eingefärbtem Kunststoff (GFK), eine Abdeckung wurde nicht verwendet. Die kleinen Becken waren in je zwei Reihen übereinander angeordnet. Die Becken waren etwa quaderförmig mit einer Grundfläche von 90x90cm (400l) bzw. 50x50cm (75l). Der Beckenboden fiel zur Mitte leicht ab, dort befand sich auch der Abfluss, in den ein etwa 20cm langes Plastikrohr eingesteckt wurde. Dieses Plastikrohr war mit zahlreichen grossen Bohrungen versehen (1cm \varnothing) und mit Gaze bespannt (Porenweite 335 μ m). Die Wasserversorgung der Versuchsbecken erfolgte im Durchfluss aus dem Ostseewasserkreislauf des Schauaquariums des Instituts. Für jedes Becken konnte der Wasserzulauf individuell geregelt werden. Vor dem Eintritt in die Versuchsbecken wurde das Ostseewasser über einen Filter mit Gaze (50 μ m) gefiltert und an einer UV-Lampe (30 Watt, Firma Wiegand) vorbeigeleitet. Die Gesamtkeimzahl konnte so um etwa 30-40% verringert werden (Ueberschär 1985) und entsprach damit der von Blaxter (1981) vorgeschlagenen Toleranzgrenze für die Fischlarvenaufzucht. Der Wassereinstrom in die Becken erfolgte dicht oberhalb und parallel zu der Wasseroberfläche. So konnte eine Kreisströmung erzeugt werden, die zum einen die Bildung eines Bakterienfilms ("Kahmhaut") an der Grenzfläche Wasser-Luft verhindern half und zum anderen verhinderte, dass sich unnatürliche Akkumulationen der jungen, noch nicht voll mobilen Larven in den Beckenecken bilden konnten. Zusätzlich erfolgte eine schwache Belüftung der Becken mit grossen Luftblasen durch eine Luftleitung vom Boden aus ohne Ausströmer. Damit sollte eine vertikale Stratifizierung verhindert und eine gleichmässige Futterverteilung erreicht werden.

Die bis hier beschriebenen technischen Anordnungen galten für die Aufzucht 1986. In Abänderung dazu wurden bei der Aufzucht 1989 die 75l-Becken in zwei grosse, etwa 2000l fassende Becken eingehängt. Diese grossen Becken wurden im Durchfluss mit Ostseewasser versorgt. Die damit erzielte Wasserummantelung der kleinen Versuchsbecken sollte

verhindern, dass schwankende Raumtemperaturen die Temperaturbedingungen in den Versuchs-

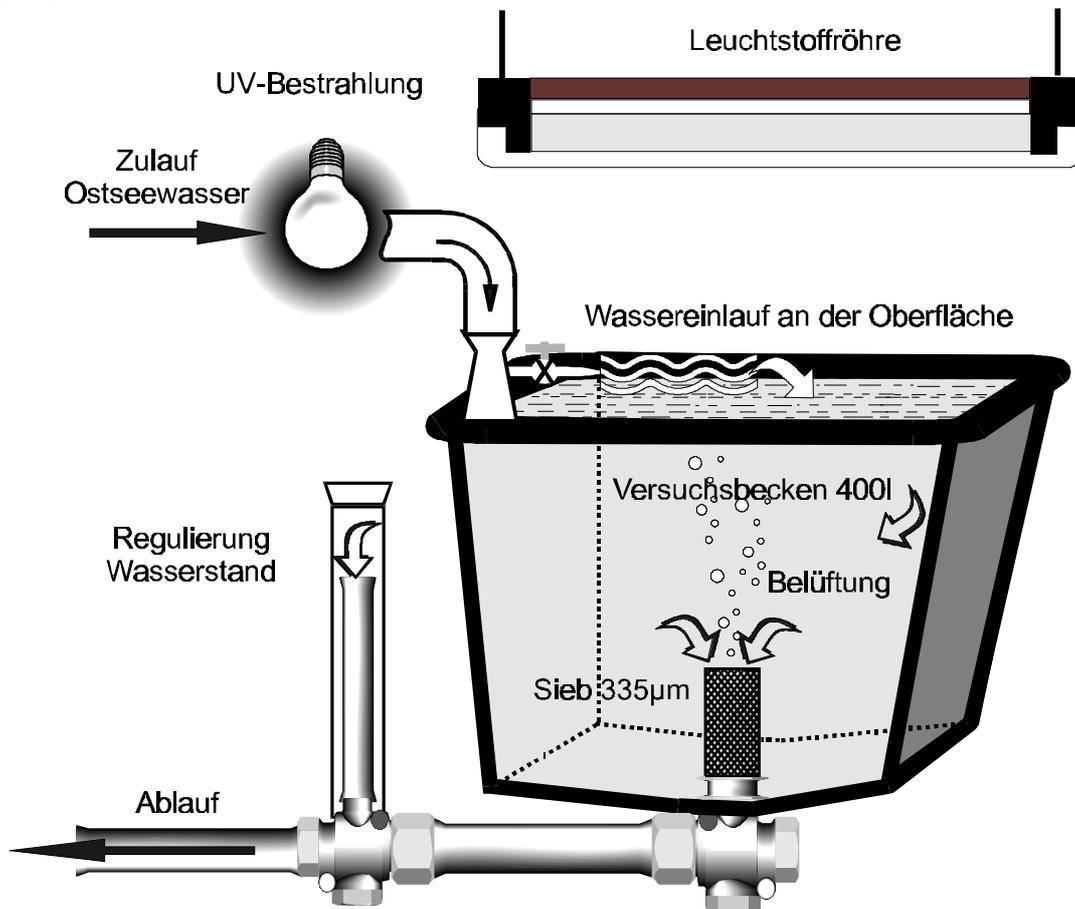


Abb. 17: Schematischer Aufbau der Larvenhaltung am Beispiel eines 400l-Beckens. Die Wasserstandsregulierung im Becken erfolgte durch ein in der Länge variables Standrohr. Der Wasserzulauf war parallel zur Oberfläche verlegt und konnte individuell reguliert werden. Zur Ausleuchtung diente eine über dem Becken in etwa 50cm Höhe über dem Wasserspiegel hängende Leuchtstoffröhre.

becken direkt beeinflussen konnten. Die Wasserversorgung der Versuchsbecken erfolgte wieder im Durchflusssystem mit Ostseewasser aus der Kieler Innenförde über die Seewasserversorgungsleitung des Instituts für Meereskunde. Vor der Einleitung in die Versuchsbecken wurde dieses Ostseewasser über eine Filterkaskade mit einer Porengröße von $50\mu\text{m}$ und $5\mu\text{m}$ geleitet (BADU-Schwimmbad-Schutzfilter, Typ SF). Anschliessend wurde das Wasser, wie schon oben beschrieben, mit UV-Licht behandelt, und dann in die Becken eingeleitet.

Beleuchtungsverhältnisse

Für die Beleuchtung der Versuchsbecken hatten sich in früheren Versuchen (Ueberschär 1985) Leuchtstoffröhren (neutral weiss, Phillips TL 65 W) als geeignet erwiesen, da diese eine gleichmässige und diffuse Beleuchtung der Becken erzeugten. Da Fischlarven ganz allgemein sehr stark positiv phototaktisch reagieren, konnten durch diffuse Beleuchtung und

mit Unterstützung der leichten Kreisströmung in den Becken schädliche Larvenkonzentrationen in den Ecken verhindert werden. Die Lichtstärke wurde mit einem Luxmeter (Li-Cor Inc., Typ Li188-B integrating quantum/radiometer/photometer) an der Wasseroberfläche kontrolliert. Es wurden Werte zwischen 200 und 570 Lux gemessen. Die Abstände der Leuchtstoffröhren von der Wasseroberfläche und der Einstrahlwinkel wurden bei allen Becken möglichst gleich gehalten. Die Beleuchtungsbedingungen waren bei den Versuchen 1986 und 1989 identisch.

Wasserdurchflussrate

Die Durchflussrate während der ersten Aufzucht 1986 betrug durchgehend etwa 60l pro Stunde. Das entsprach im Verhältnis zum gesamten Wasservolumen in der Versuchsanlage einer etwa 0.8fachen Wassererneuerung in 24 Stunden. Diese Durchflussrate hatte sich in früheren Versuchen bewährt (Ueberschär 1985). Einerseits konnte so eine gute Wasserqualität erreicht werden und zum anderen wurde eine zu hohe Verdünnung der Futterkonzentrationen in den Versuchsbecken verhindert. Zu Beginn der zweiten Aufzucht 1989 wurden die Heringslarven während der ersten 6 Tage zugunsten hoher Rotatorienichten in stehendem Wasser gehalten, dem eine *Nannochloris*-Algensuspension zugegeben wurde ("Green-Water"-Technik).

Wasserqualität

Während einer früheren, vergleichbaren Heringslarvenaufzucht (Ueberschär 1985) wurden bei der Bestimmung der Parameter Sauerstoff, Ammonium und pH-Wert niemals Werte in der Nähe kritischer Grenzen gemessen. Die Wasserqualität entsprach bei diesen früheren Versuchen in allen wichtigen Parametern den Anforderungen für eine erfolgreiche Larvenaufzucht, obwohl die Durchflussrate unter der von Blaxter (1981) vorgeschlagenen Austauschrate von 10% vom Wasservolumen pro Stunde lag. Auf eine Bestimmung von Wasserparametern bei der Aufzucht 1986 und 1989 wurde deshalb verzichtet.

Temperatur- und Salzgehaltsverlauf

Die Temperatur wurde in allen Versuchsbecken täglich mit einem Quecksilberthermometer gemessen und der Salzgehalt wöchentlich über die Dichte δ (Aerometer) bestimmt. Den Mittelwert aus diesen Messungen zeigt die Abb. 18 für die Bedingungen bei der Aufzucht 1986. Die Temperatur schwankte zwischen 13.3° und 16.9°C mit einem Mittelwert von 14.9°C. Der Salzgehalt war fast konstant mit Werten zwischen 15.1 und 15.9 psu, der Mittelwert betrug 15.5 psu.

Während der Aufzucht 1989 bewegten sich die Temperaturen in den Versuchsbecken zwischen 12.0° und 17.4°C mit einem mittleren Wert von 14.7°C. Damit schwankten die Temperaturen etwas stärker als während der Aufzucht 1986, die Mittelwerte waren aber sehr ähnlich (Abb. 19). Der Salzgehalt lag mit Werten zwischen 15.9 psu und 16.5 psu und einem mittleren Wert von 16.2 psu insgesamt etwas höher als 1986.

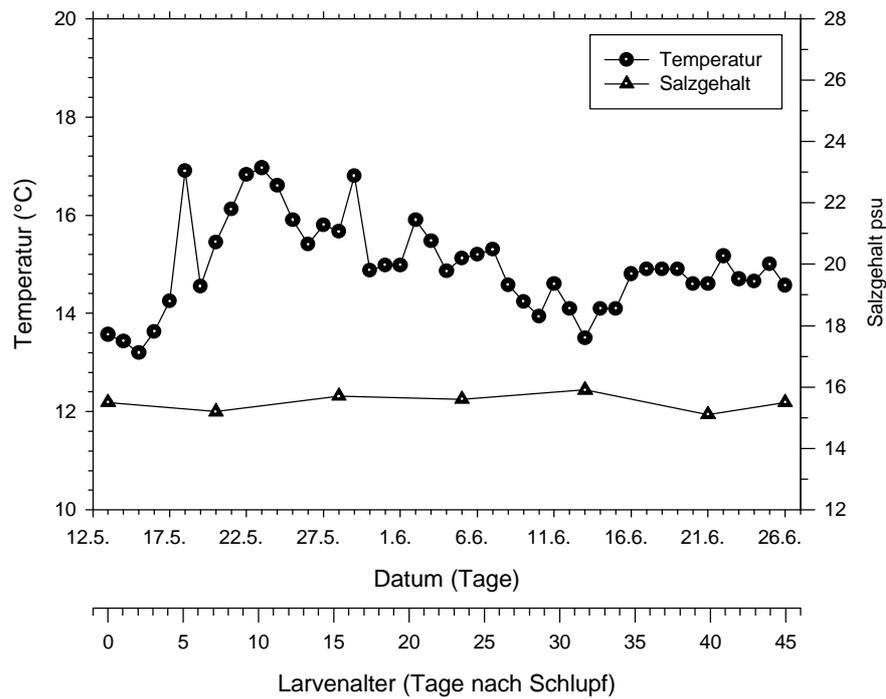


Abb. 18: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf als Mittelwert aus allen Versuchsbecken der Heringslarvenaufzucht 1986. Die Temperatur wurde täglich gemessen, der Salzgehalt wöchentlich bestimmt. Die kalendarische Zeitachse soll die Einordnung der Versuche in die Jahreszeit veranschaulichen.

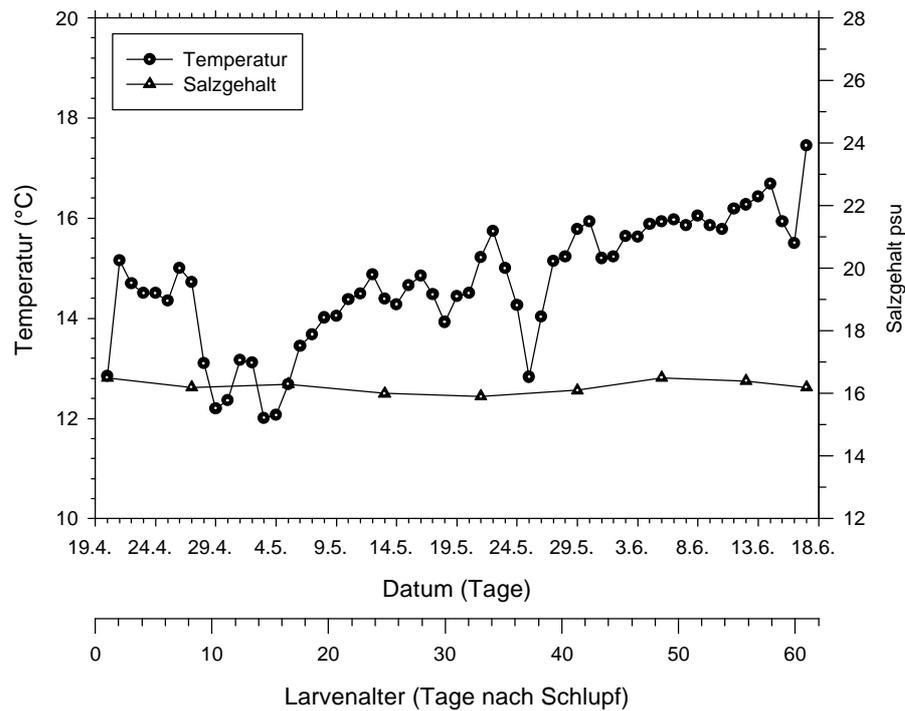


Abb. 19: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf als Mittelwert aus allen Versuchsbecken der Heringslarvenaufzucht 1989. Die Temperatur wurde täglich gemessen, der Salzgehalt wöchentlich bestimmt. Die kalendarische Zeitachse soll die Einordnung der Versuche in die Jahreszeit veranschaulichen.

Futterproduktion

Die Heringslarven wurden während der gesamten Aufzuchtversuche ausschliesslich mit Rotatorien (*Brachionus plicatilis*) und frischgeschlüpften Nauplien von *Artemia spec.* gefüttert. Für die Kultur der für die Fütterung der Rotatorien verwendeten Grünalgen (Monokultur von *Nannochloris spec.*) und für die Aufzucht der Rotatorien wurden zwei gleichartige, übereinander installierte Rundbecken aus klarem Plexiglas mit konisch zulaufendem Boden und Abfluss in der Beckenbodenmitte und einem Fassungsvermögen von etwa 275l verwendet (Abb. 20).

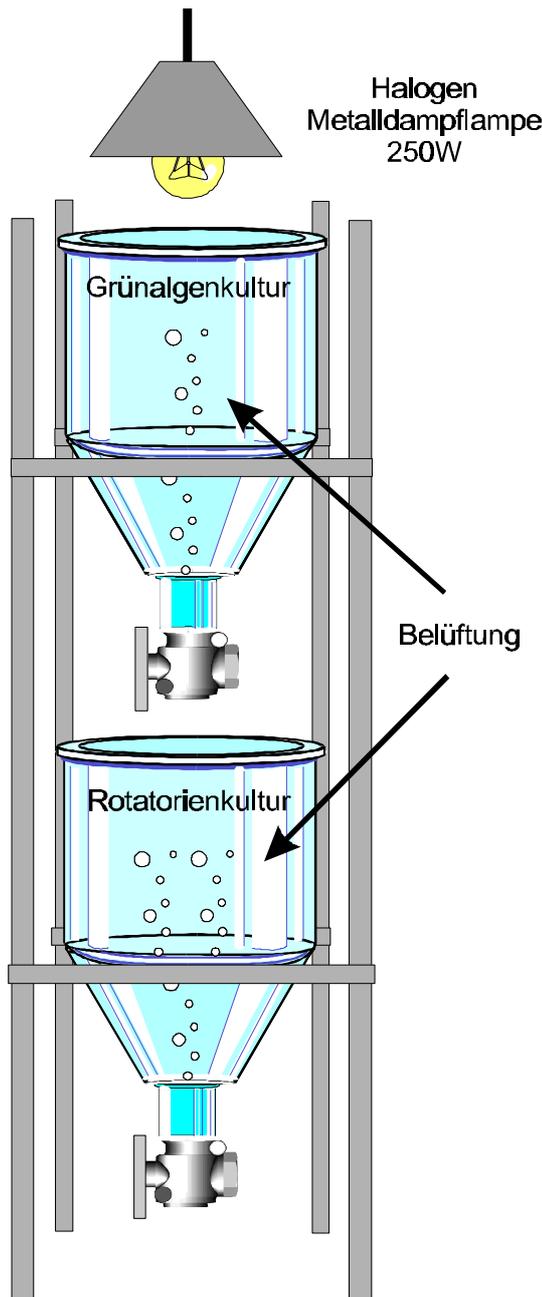


Abb. 20: Schematische Darstellung der Anordnung der Plexiglasrundbecken zur Produktion von Grünalgen (*Nannochloris spec.*) und Rotatorien (*Brachionus plicatilis*).

Zur Auffüllung der Algenkultur wurde Wasser aus der Ostseeleitung über einen Filter mit 10µm Porenweite geleitet. Zur Rotatorienenernte wurde die auf der Basis der Rotatoriendichte berechnete Menge Wasser aus dem Rotatorienbecken über ein Sieb mit 50µm Maschenweite filtriert. Zur Bestimmung der Rotatoriendichte in den Aufzuchteinheiten wurden Unterproben in eine *Bogorov*-Schale überführt und unter dem Binokular ausgezählt. Die Rotatorien wurden etwa eine Stunde vor der Ernte mit frischer Grünalgensuspension versorgt, um den Nährwert für die Fischlarven zu optimieren. Die Rotatorien wurden stets frisch unmittelbar nach der Ernte an die Fischlarven verfüttert. Zur

Die Rotatorienkultur wurde mit einem Heizstab gleichmässig auf 25.5°C temperiert und mit einem 30cm langen Belüftungsstab belüftet. Die Grünalgen wurden bei einer Beleuchtungsdauer von täglich 15 Stunden mit einer Halogenmetallampfenstrahler (FS Leistungsstrahler, 250 W Typ 412/252) bestrahlt, mit einer Intensität von etwa 60.000 Lux an der Wasseroberfläche des Plexiglaszylinders mit der Algenkultur. Durch die hohe Strahlung war eine zusätzliche Beheizung nicht notwendig. Zur gleichmässigen Lichtexposition der Algenzellen und um den CO₂ Eintrag in die Algenkultur zu unterstützen, wurde mit einem 30cm langen Belüftungsstab Turbulenz erzeugt. Für die Anreicherung der Algenkultur mit Nährstoffen wurde "Nitrophaska Blau", in Frischwasser vortropfen, verwendet (Witt et al. 1981).

Zur Versorgung der Rotatorien mit Algensuspension wurde die gewünschte Menge in den darunter angeordneten Rotatorientank durch ein Kugelventil abgelassen. Durch diese Anordnung war die Gefahr einer unerwünschten Kontamination der Algenkultur mit Rotatorien gering.

Sicherstellung der Futtermittellieferung mit Rotatorien wurden parallel zwei identische Anlagen in der oben beschriebenen Art betrieben und wechselweise beerntet.

Zur Produktion von *Artemia*-Nauplien (Produkt "San Francisco Brand, High Quality") wurde ein 40l fassendes Becken mit quadratischem Querschnitt und stark konisch zulaufendem Beckenboden aus Plexiglas verwendet. Dieses Becken wurde von unten belüftet, um ausreichende Turbulenzen zu erzeugen und für eine gleichmäßige Versorgung der *Artemia*-Eier mit Sauerstoff zu sorgen. Die Nauplien wurden in 25°C temperiertem Wasser aus dem Nordseekreislauf des IfM (33 psu) erbrütet. Unter diesen Bedingungen wurde eine maximale Schlupfrate nach 24 Stunden erreicht. Die Ernte wurde durch Konzentration der frischgeschlüpften Nauplien mit einer Lichtquelle erleichtert. So konnte die Kontamination der Versuchsbecken mit Eihüllen und toten Eiern weitgehend vermieden werden. Besonders die scharfkantigen Eihüllen von *Artemia*-Nauplien können, wenn sie von den Larven als vermeintliche Futterpartikel aufgenommen werden, innere Verletzungen verursachen, die zu einer Erhöhung der Larvenmortalität führen können. Die Naupliendichte im abgessaugten Volumen (normiert auf 1 Liter) wurde durch Auszählen von verdünnten Unterproben in einer *Bogorov*-Schale ermittelt.

Fütterungskonditionen

Die Fütterung der Heringslarven erfolgte im täglichen Rhythmus etwa zur gleichen Tageszeit am Vormittag und wurde bei beiden Aufzuchten begonnen, nachdem die Larven einen Tag alt waren. Die erste Fütterung soll nach Gadowski & Petersen (1988) noch vor der vollständigen Resorption des Dottervorrats beginnen, da dann mit einer höheren Überlebensrate gerechnet werden kann.

Als Erstfutter wurde den Heringslarven bei beiden Aufzuchtversuchen Rotatorien angeboten. 1986 wurden dann ab dem 16. Tag zusätzlich *Artemia*-Nauplien gefüttert. Ab dem 28. Tag nach Schlupf wurden nur noch Nauplien angeboten. 1989 wurden ab dem 19. Tag *Artemia*-Nauplien zusätzlich angeboten, die Mischfütterung aber bis zum Versuchsende beibehalten.

Um definierte Bedingungen hinsichtlich der Futterdichte in den Versuchsbecken einhalten zu können, wurde bei der Aufzucht 1986 vor der Zugabe von frischen Futterorganismen die Restdichte der vom Vortag in den Becken verbliebenen Futterorganismen festgestellt. Dazu wurden jeweils 3 Proben aus jedem Becken entnommen und die Anzahl der Nahrungspartikel unter dem Binokular ausgezählt. Unter Berücksichtigung dieser Restfutterdichte wurde die zur Einstellung der jeweiligen Futterdichte nötige Menge Rotatorien bzw. Nauplien in die Versuchsbecken gegeben.

1989 wurde auf eine Restfutterdichtebestimmung vor der Zufütterung mit frischen Rotatorien und Nauplien in den Versuchsbecken verzichtet, da sich die Bestimmung der in den

Versuchsbecken verbliebenen Futterorganismen durch nicht ganz zu verhindernde Aggregationen als eher schwierig und ungenau erwiesen hatte und der Nährwert der verbliebenen Rotatorien bzw. der *Artemia*-Nauplien wegen fehlender Nahrung als minderwertig angesehen werden kann.

1986 wurde als Standard eine Futterdichte von 3.0 Rotatorien ml^{-1} und 0.5 Nauplien ml^{-1} eingestellt. Bei der Heringslarvenaufzucht 1989 wurden zusätzlich auch Versuche mit unterschiedlichen Futterdichten durchgeführt. Ergebnisse von Werner & Blaxter (1980, 1981) und Schnack (1981) wurden berücksichtigt, um eine hohe (5.0 Rotatorien ml^{-1} + 1.0 Nauplien ml^{-1}) sowie eine geringe Futterdichte (0.1 Rotatorien ml^{-1} + 0.01 Nauplien ml^{-1}) einzustellen. Die hohen Futterkonzentrationen entsprachen den von verschiedenen Autoren vorgeschlagenen Dichten für die Aufzucht von Herings- und Steinbuttlarven (Blaxter & Hunter 1982, Blaxter 1981, Kuhlmann et al. 1981). Daneben wurden bei beiden Versuchsdurchgängen in regelmässigen Intervallen Heringslarven unter Futterentzug gehalten.

Besatz und Probennahme

1986 wurden die frischgeschlüpften Heringslarven gleichmässig auf alle Versuchsbecken verteilt. Die genaue Besatzdichte wurde aber nicht festgestellt. Die 400l-Becken enthielten einen Pool von dauerhaft gefütterten Heringslarven die während des Versuchszeitraums zum Teil in die 75l-Becken für Hungerversuche umgesetzt wurden. Das Probennahmeschema zeigt die Häufigkeit der Probennahme und die jeweiligen Futter- bzw. Hungerbedingungen für die Heringslarvenaufzucht 1986 (Abb. 21).

Bei den Versuchen 1989 war die Präferenz, eine möglichst lange Versuchsdauer zu erzielen. Deshalb wurden die Heringslarven zunächst auf die 400l-Becken verteilt und bei hoher Futterdichte angefüttert. Diese grossen Becken dienten dann zum einen als Probennahme-pool für die Versuchsbedingung hohe Futterdichte, zum anderen wurden aus diesen Becken die Heringslarven für die jeweiligen Versuche mit geringer Futterdichte und die Hungerversuche in die 75l-Becken umgesetzt. In den kleinen Becken wurde bei Fütterungsexperimenten eine möglichst gleichmässige Larvendichte von 13 Heringslarven pro Liter angestrebt. Bei Hungerexperimenten reichte eine Anfangsdichte von 4 Larven pro Liter um den Probenbedarf des jeweiligen Intervalls zu decken. Das Probennahmeschema für die Heringslarvenaufzucht 1989 zeigt die Abb. 22

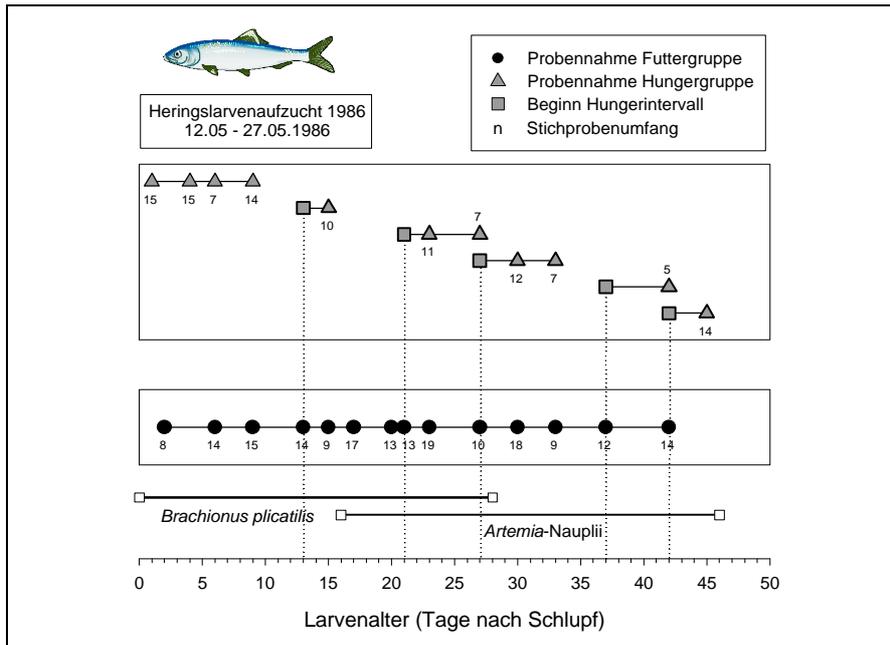


Abb. 21: Probennahmeschema während der Heringslarvenaufzucht 1986. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste 46 Tage vom Schlupf bis zur letzten Probennahme. Die Abbildung gibt Auskunft über die Probenahmetermine für die Futtergruppen und zeigt den Beginn (gepunktete Linien), die Dauer und die Probenahmetermine für die Hungerintervalle. Alle Proben wurden vor der täglichen Futterzugabe entnommen. Die Zahlen (n) bezeichnen den Stichprobenumfang der jeweils analysierten Individuen. Zusätzlich sind die Futterbedingungen über den Versuchszeitraum skizziert.

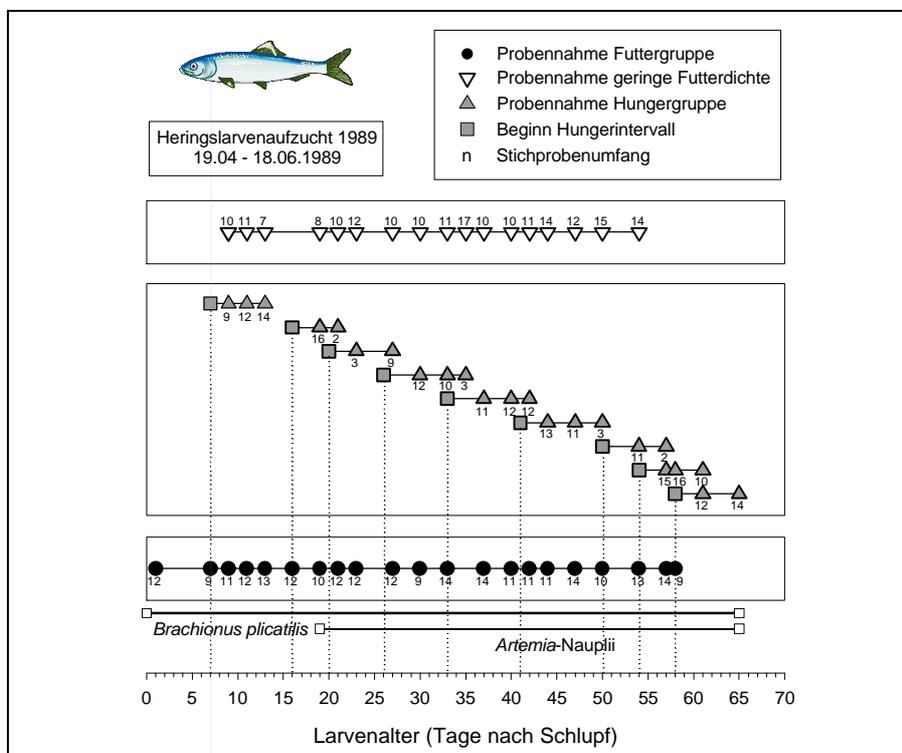


Abb. 22: Probennahmeschema während der Heringslarvenaufzucht 1989. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste 65 Tage vom Schlupf bis zur letzten Probennahme. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.

In der Regel wurden Proben nur einmal am Tag und stets vor der täglichen Fütterung etwa immer zu gleicher Zeit entnommen, um einen möglichen endogenen Rhythmus bei den Enzymaktivitäten zu berücksichtigen. Bei einigen Versuchen sollten jedoch gezielt die Veränderungen der Enzymaktivitäten im Stundenrhythmus, insbesondere als Reaktion auf die Futteraufnahme untersucht werden. In diesen Fällen wurden stündliche Probenahmen vor und nach der Fütterung durchgeführt.

Die für die Konservierung vorgesehenen Larven wurden jeweils mit einem 100 ml Becherglas in der gewünschten Anzahl den Versuchsbecken entnommen und dann mit Hilfe einer präparierten Pasteur Pipette sofort in Eppendorf-Reaktionsgefäße (1.5 ml) überführt, die jeweils mit etwas Wasser aus den Versuchsbecken gefüllt wurden. In der Regel wurden 10 Larven pro Reaktionsgefäß konserviert. Die Lagerung der Proben bis zur Analyse erfolgte in einer Spezialtiefkühltruhe bei -72°C . Aus der Lebensmitteltechnologie ist bekannt, dass schon bei -18° bis -25°C proteolytische Enzyme nur noch eine äusserst geringe Aktivität aufweisen (Fricker 1969). Eine enzymatische Veränderung der Proben, auch bei längerer Lagerung, konnte damit ausgeschlossen werden.

Interkalibrierungsversuch mit Heringslarven

Für den methodischen Vergleich zwischen der Quantifizierung von Trypsin mit Hilfe eines Radioimmunoassays (Hjelmeland & Jørgensen 1985) und der in dieser Arbeit angewandten Trypsinaktivitätsmessung wurden Homogenate von im Marine Biological Laboratory³ aufgezogenen Heringslarven verwendet. Die Aufzucht dieser Heringslarven ist im Detail bei Ueberschär et al. (1992) beschrieben. Für diesen Interkalibrierungsversuch wurden die Heringslarven präpariert, d.h. der Darmtrakt mit dem aktiven Trypsin und der Pankreas als Ort der Enzymsynthese und Speicherorgan für Trypsinogen wurden getrennt untersucht. Einzelheiten zur Präparation sind bei Pedersen et al. (1987) beschrieben.

2.2.2.2 Steinbutt (*Scophthalmus maximus* L.)

In der früheren Aussenstelle Aquakulturforschung des Instituts für Meereskunde (siehe BMFT-Jahresbericht 1985) werden seit 1979 Steinbutt bis zur Laichreife aufgezogen. Die Anlage verfügte zum Zeitpunkt dieser Arbeit über einen ständigen Laichfischbestand vom Ostseesteinbutt, von dem auch die Gameten für die in dieser Arbeit durchgeführten Aufzuchten stammten. Insgesamt wurden zwei sich überschneidende Aufzuchten mit Probenahmen im Zeitraum vom 14.06 bis zum 30.07 durchgeführt. Für den ersten Ansatz wurden etwa 60.000 abgestreifte Eier von zwei Steinbuttweibchen verwendet. Die Erbrütung der Eier erfolgte zunächst in einer Unterstromapparatur bei 18°C (Kuhlmann et al. 1981). Kurz vor dem Schlupftermin (4. Inkubationstag) wurden diese Eier in die Versuchsanlage in das Institut für Meereskunde transportiert und in ein Erbrütungsbecken bei 16.5°C eingesetzt.

³ Marine Biological Laboratory, University of Copenhagen, Strandpromenaden 5, Helsingør, Denmark

Der Schlupfpeak war am 6. Tag nach der Befruchtung zu beobachten. Beim zweiten Ansatz wurden etwa 40.000 Eier von einem Steinbuttweibchen inkubiert, das weitere Verfahren entsprach genau dem des ersten Ansatzes. Auch beim Ansatz II fand am 6. Tag nach der Befruchtung der Massenschlupf statt. Der Schlupferfolg lag bei beiden Ansätzen nur bei etwa 30% und blieb dabei hinter der erwarteten Schlupfrate von 80% (Kuhlmann et al. 1981) deutlich zurück.

Larvenhaltung

Als Versuchsanlage zur Durchführung der Experimente diente die unter 2.2.2.1 bereits ausführlich beschriebene Anlage für die Versuche mit Heringslarven.

Abiotische Verhältnisse in der Versuchsanlage.

Die Beleuchtungsverhältnisse, die Wasserdurchflussrate und die Wasserqualität entsprachen den Bedingungen wie oben beschrieben für die Heringslarvenaufzucht 1986.

Temperatur- und Salzgehaltsverlauf

Den Verlauf der Mittelwerte für Temperatur und Salzgehalt zeigt die Abb. 23. Die Temperatur schwankte bei der ersten Aufzucht zwischen 15.2°C und 19.1°C mit einem Mittelwert von 16.7°C. Der Salzgehalt war fast konstant mit Werten zwischen 16.0 und 16.3 psu, der Mittelwert lag bei 16.2 psu. Bei der zweiten Aufzucht wurde eine Wassertemperatur zwischen 15.2°C und 17.5°C mit einem Mittelwert von 15.9°C gemessen. Der Salzgehalt blieb fast konstant mit leichten Schwankungen zwischen 16.1 und 16.3 psu, der Mittelwert lag bei 16.2psu.

Futterproduktion

Die Steinbuttlarven wurden, genau wie die Heringslarven, mit derselben Kombination aus Rotatorien (*Brachionus plicatilis*) und frischgeschlüpften *Artemia*-Nauplien gefüttert. Die Produktion und Bereitstellung der Futterorganismen erfolgte mit derselben Technik wie bei der Heringslarvenaufzucht 1986.

Fütterungskonditionen

Die Fütterung der Steinbuttlarven erfolgte täglich etwa immer zur gleichen Zeit am Vormittag. Neben der Futtergruppe mit hohen Futterdichten wurden Versuche mit geringen Futterdichten durchgeführt. Als hohe Futterdichte wurden bei beiden Aufzuchten eine durchschnittliche Konzentration von 2.0 Rotatorien ml⁻¹ + 1.0 Nauplien ml⁻¹ eingestellt. Als geringe Futterdichte wurden 0.5 Rotatorien/Liter + 0,05 Nauplien ml⁻¹ definiert.

Besatz und Probennahme

Die frischgeschlüpften Larven wurden bei beiden Ansätzen mit einer Dichte von 13-20 Larven pro Liter auf die einzelnen Versuchsbecken verteilt. Ein 400l-Becken diente wieder, analog zu der Heringslarvenaufzucht, als Pool zur Probengewinnung von Steinbuttlarven

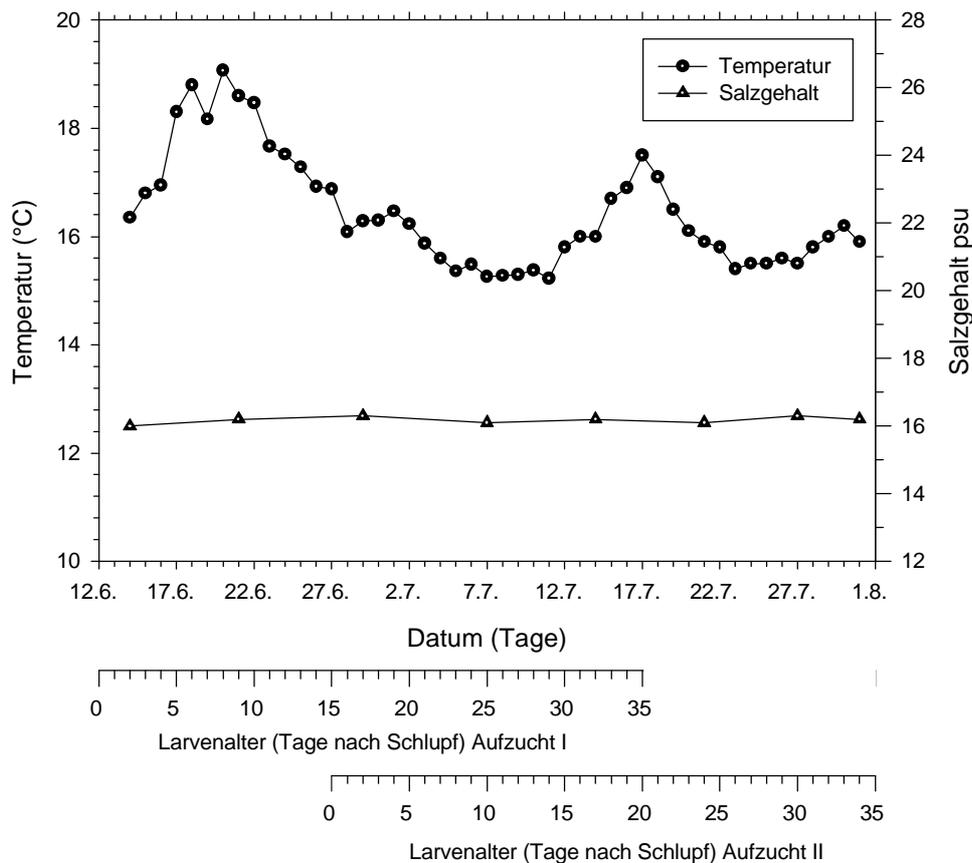


Abb. 23: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf als Mittelwert aus allen Versuchsbecken während der Steinbuttlarvenaufzucht I+II 1986. Die Temperatur wurde täglich gemessen, der Salzgehalt wöchentlich bestimmt. Die kalendarische Zeitachse (oben) soll die Einordnung der Versuche in die Jahreszeit veranschaulichen, die unteren Skalen zeigen das Larvenalter.

denen eine hohe Futterdichte angeboten wurde und als Vorrat für Futterdichte- und Hungerversuche, die in Intervallen in den kleineren Versuchsbecken durchgeführt wurden. Die Probenahme entsprach der bei den Heringslarven angewandten Technik. Die Lagerung der Proben bis zur Analyse erfolgte in einer Spezialtiefkühltruhe bei -72°C .

Das Probennahmeschema zeigt die Häufigkeit der Probenahme und die jeweiligen Futter- und Hungerbedingungen für die Steinbuttlarvenaufzucht I 1986 (Abb. 24). Zur Bestimmung der Tagesperiodik der Trypsinaktivität wurden Proben an ausgewählten Tagen im Stundenrhythmus vor und nach der Fütterung genommen. Für diesen Teil der Untersuchungen wurden zusätzlich zu den Proben von den selbst im Institut durchgeführten Experimenten Proben aus einer laufenden Steinbuttlarvenaufzucht der Firma BUTT entnommen. Der Vergleich der Messungen an diesen Proben sollte auch einen Eindruck darüber geben, wie die eigene, im kleinen experimentellen Maßstab durchgeführte Steinbuttlarvenaufzucht, im Vergleich mit den Proben aus einer professionellen Aufzucht einzuordnen ist.

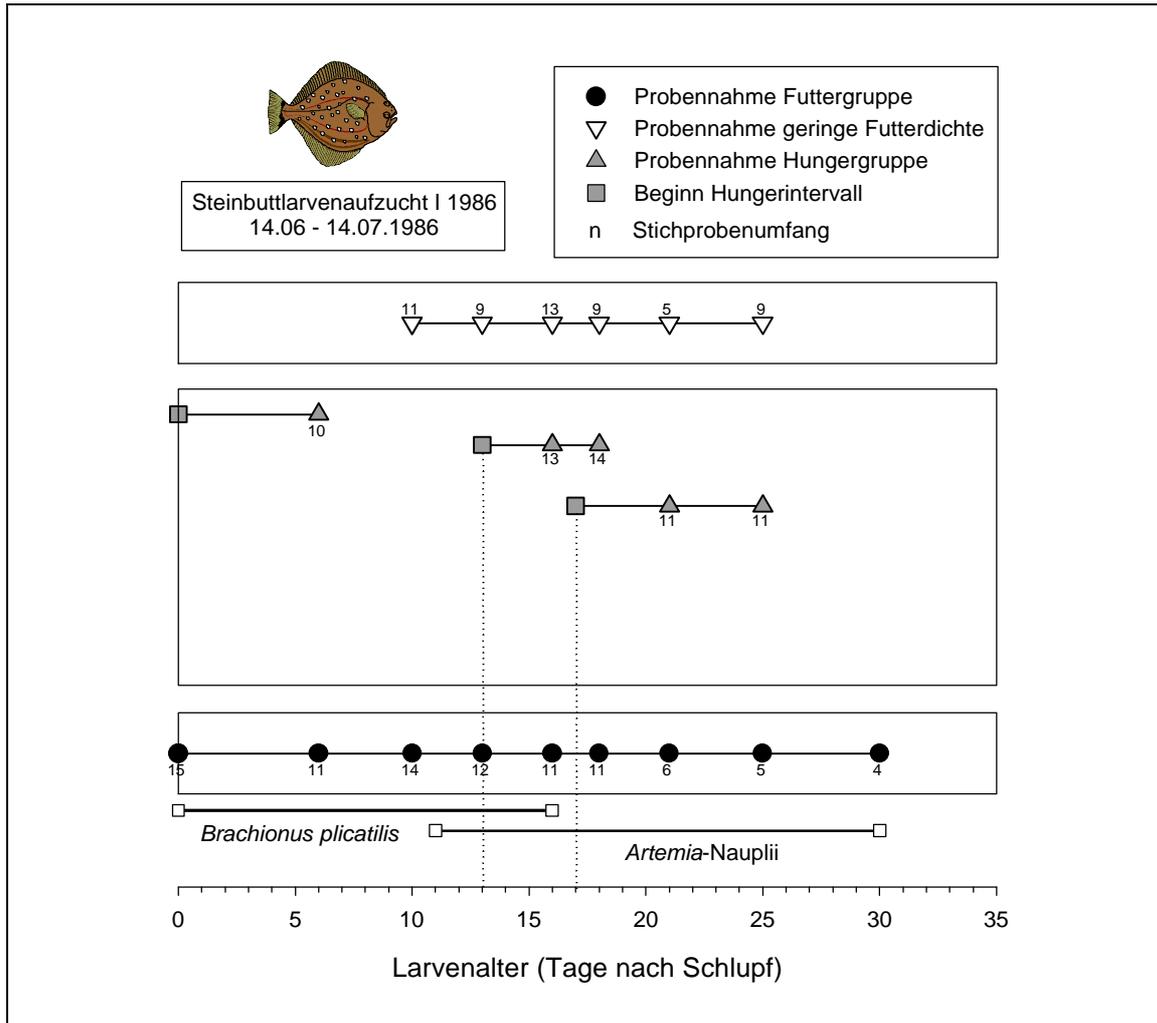


Abb. 24: Probennahmeschema während der Steinbuttlarvenaufzucht I, 1986. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste 30 Tage vom Schlupf bis zur letzten Probennahme. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.

Die zeitliche Überschneidung beider Steinbuttaufzuchten 1986 resultierte in nahezu identischen Versuchsbedingungen, ein Vorteil für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Das Probennahmeschema für die zweite Steinbuttlarvenaufzucht zeigt die Abb. 25.

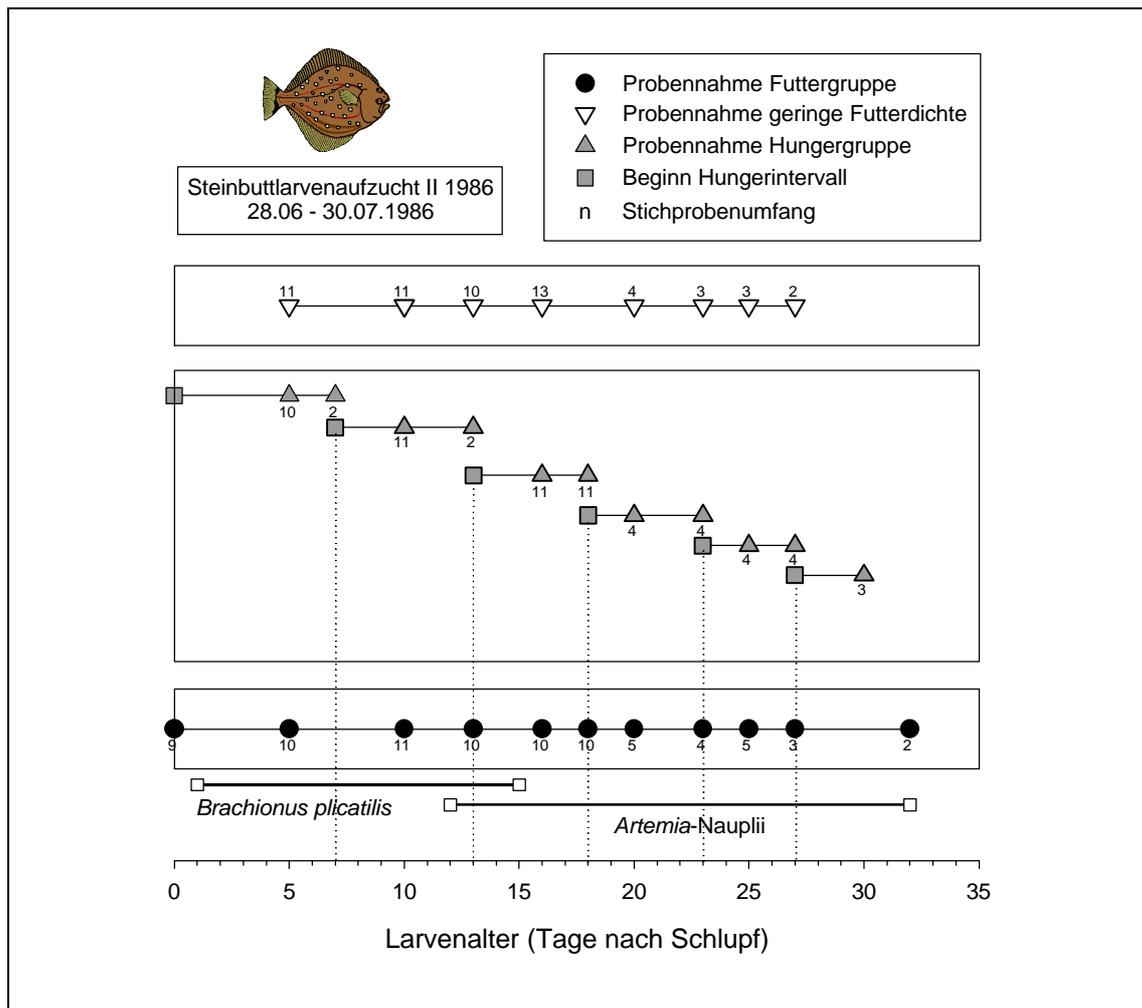


Abb. 25: Probennahmeschema während der Steinbuttlarvenaufzucht II, 1986. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste 32 Tage vom Schlupf bis zur letzten Probennahme. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.

2.2.2.3 Dorsch (*Gadus morhua* L.)

Die Kalibrierungsexperimente mit den Dorschlarven wurden unter professionellen Bedingungen in den Anlagen der Firma BUTT im Frühjahr 1994 durchgeführt.

Die Gameten stammten von laichreifen Ostseedorschen, die in der Eckernförder Bucht gefangen und in grossen Becken gehältert wurden, bis sie auf natürliche Weise abgelaicht hatten. Die Befruchtungsrates betrug etwa 90%. Die befruchteten Eier wurden in einer Unterstromapparatur erbrütet, wie sie auch für Steinbutteier verwendet wurde. Nach einer Inkubationszeit von 16 Tagen bei einer Temperatur zwischen 6.0°C und 8.8°C waren etwa 90% der Larven geschlüpft.

Larvenhaltung

Nach dem Schlupf wurden die Larven als komplette Kohorte (Batch Nr. 4, etwa 150.000 Larven) in ein grosses Rundbecken mit einem Beckenvolumen von 1450l umgesetzt. Um

die Schwebfähigkeit der frischgeschlüpften Larven zu unterstützen, wurde das Ostseewasser auf 25 psu aufgesalzen. Um den höheren Salzgehalt einzuhalten, wurden die Dorschlarven während der ersten 21 Tage bei stehendem Wasser mit leichter Belüftung gehalten. Für Hungerexperimente wurde ein 10l-Kunststoffeimer verwendet, der durch einen Schlauchring schwimmfähig gemacht wurde und dessen Boden durch Gaze mit einer Maschenweite von 10µm ersetzt worden war. Dieser Eimer wurde direkt in das grosse Hälterungsbecken frei flottierend eingehängt.

Beleuchtungsverhältnisse

Das Aufzuchtbecken wurde mit einer Neonröhre schwach beleuchtet (60cm, 32 Watt, neutralweiss). Angaben über die Lichtstärke liegen nicht vor.

Wasserdurchflussrate

Ab dem 22. Tag wurde ein leichter Wasseraustausch begonnen mit Ostseewasser aus der Seewasserleitung der Firma BUTT, und der Salzgehalt langsam dem Salzgehalt des Ostseewassers angeglichen. Über Durchflussraten liegen keine Angaben vor.

Wasserqualität

Die Beobachtung der Wasserparameter wurden im Rahmen der täglichen Routine von der Firma BUTT selber durchgeführt. Die Sauerstoffsättigung war stets über 90%, die anderen Parameter wie Ammonium, Nitrit/Nitrat und pH erreichten zu keinem Zeitpunkt kritische Werte.

Temperatur- und Salzgehaltsverlauf

Die Temperatur und der Salzgehalt in dem Aufzuchtbecken wurden täglich bestimmt. Der Temperatur- und Salzgehaltsverlauf während der Dorschlarvenaufzucht sind im einzelnen in der Abb. 26 dargestellt.

Um optimale Temperaturen für die Dorschlarven einzuhalten, wurde das Beckenwasser gekühlt. Die Temperatur zeigte trotz der Kühlung im Verlauf der Aufzucht leicht ansteigende Tendenz und erreichte Werte von 7.1°C bis 9.5°C mit einem mittleren Wert von 8.2°C. Der Salzgehalt wurde bis zum 21. Tag auf 25 psu fixiert und hatte dann fallende Tendenz bis fast das Niveau des natürlichen Salzgehaltes des zulaufenden Ostseewassers erreicht worden war (17 psu).

Futterproduktion

Die Produktion der Futterorganismen *Brachionus plicatilis* und *Artemia*-Nauplien erfolgte nach den bewährten Routineverfahren der Firma BUTT, auf die hier im einzelnen nicht eingegangen wird. Die Rotatorien wurden mit Grünalgen (*Nannochloris spec.*) aufgezogen und kurz vor der Fütterung mit *Protein Selco* (*Artemia* Systems, Belgien) angereichert. Die

Artemia-Nauplien (Firma Argent, Produkt "Argentemia, San Franzisko Brand", Grade I, Gold

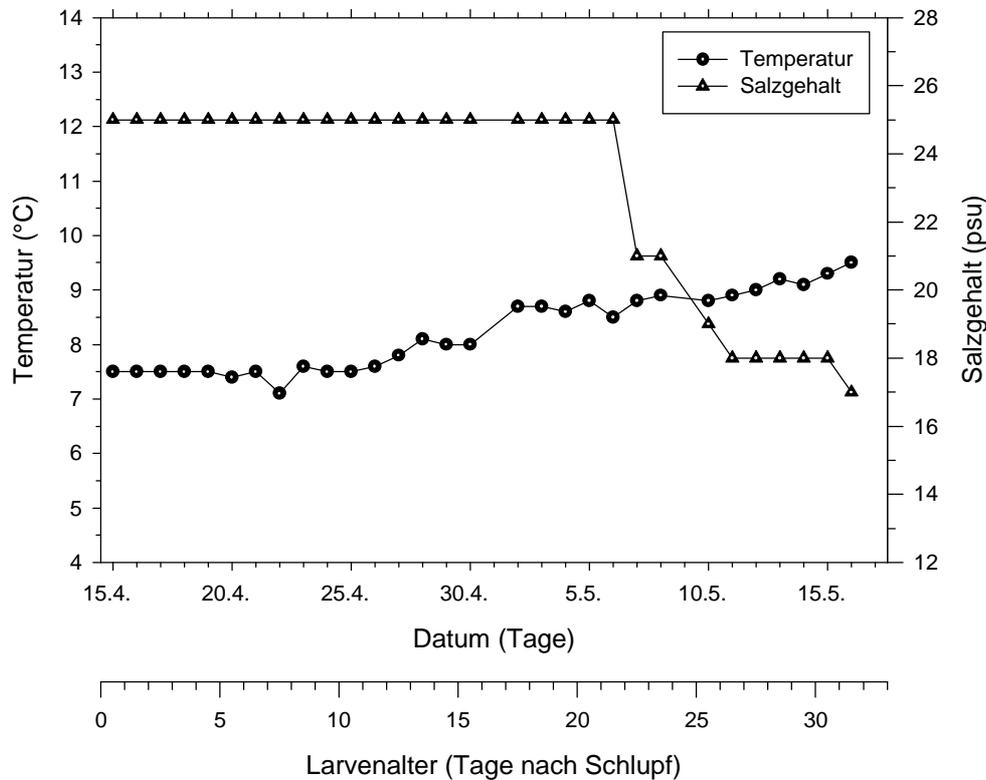


Abb. 26: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf bei der Dorschlarvenaufzucht 1994. Temperatur und Salzgehalt wurde, bis auf wenige Ausnahmen, täglich gemessen. Die kalendarische Zeitachse soll die Einordnung der Versuche in die Jahreszeit veranschaulichen.

Label, Naupliengrösse 450-475 μm) wurden nach dem Schlupf 24 Stunden lang mit *Frippak* (*Sanofi Aquaculture*, Frankreich) angereichert und dann an die Dorschlarven verfüttert.

Fütterungskonditionen

Die Dorschlarven wurden am ersten Tag nach dem Schlupf erstmalig mit Rotatorien gefüttert. Die Futterdichte wurde im Mittel auf 2.0 Rotatorien ml^{-1} eingestellt. Ab dem 8. Tag nach dem Schlupf wurden zusätzlich *Artemia*-Nauplien mit einer Dichte von durchschnittlich 0.5 Nauplien ml^{-1} angeboten. Ab dem 13. Tag nach dem Schlupf wurden nur noch *Artemia*-Nauplien angeboten.

Probennahme

Gefütterte Dorschlarven wurden aus dem grossen Tank entnommen. Die Probennahme fand stets vor der täglichen Fütterung statt. Insgesamt wurden 3 Hungerintervalle durchgeführt. Die Larven für diese Versuche wurden jeweils in ausreichender Zahl für die vorgesehene Probenhäufigkeit aus dem grossen Becken in den in diesem Becken schwimmenden Eimer umgesetzt. Dabei wurde eine Verschleppung von Futterorganismen in den Eimer

weitestgehend vermieden. Die Abb. 27 zeigt das Probennahmeschema für die Dorschlarvenaufzucht 1994.

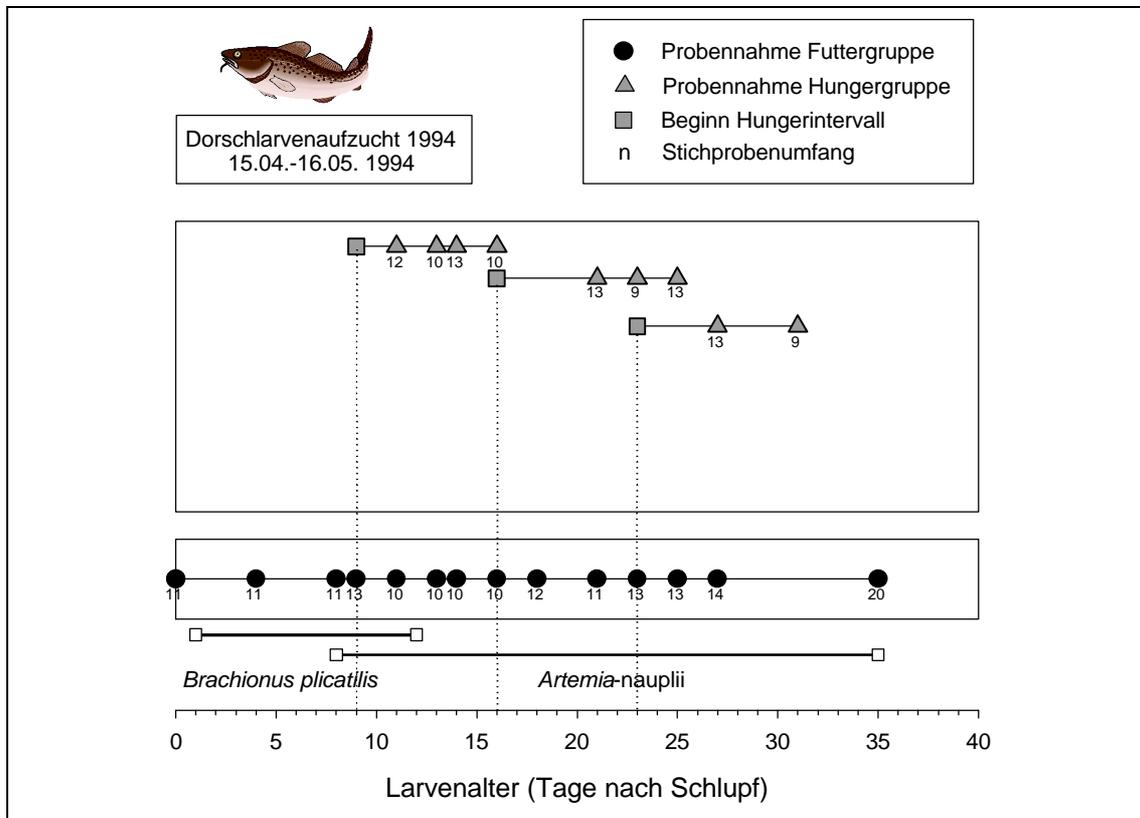


Abb. 27: Probennahmeschema für die Dorschlarvenaufzucht 1994. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste 35 Tage vom Schlupf bis zur letzten Probennahme. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.

Die Larven wurden mit Bechergläsern aus dem Versuchsbecken bzw. dem Eimer entnommen und sofort mit Pipetten in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße mit den Larvenproben wurden jeweils zunächst einige Tage in flüssigem Stickstoff aufbewahrt und dann bis zur Analyse bei -74°C in einer Tiefkühltruhe gelagert.

Vom Danish Institute for Fisheries in Charlottenlund/Dänemark wurden Proben von dort durchgeführten Experimenten mit 16 Tage alten Dorschlarven zur Untersuchung der tagessynchronen Schwankungen der Trypsinaktivitäten bei unterschiedlichen Futterdichten zur Verfügung gestellt.

2.2.2.3 Wolfsbarsch (*Dicentrarchus labrax* L.)

Die Fütterungsexperimente mit den Wolfsbarschlarven wurden im Zusammenhang mit einer großskaligen Wolfsbarschlarvenaufzucht in den gleichen Becken wie die Dorschlarvenaufzucht in den Anlagen der Firma BUTT im Frühjahr 1994 durchgeführt.

Für diese Aufzucht wurden frisch geschlüpfte Wolfsbarschlarven von einem kommerziellen Satzfishbetrieb in Frankreich bezogen (*Ecloserie Marine de Gravelines*, Gravelines, Frankreich).

Larvenhaltung

Etwa 50.000 Dottersacklarven wurden in ein grosses Rundbecken mit einem Volumen von 1450l eingesetzt. Der Salzgehalt wurde zunächst auf die Verhältnisse in der Aufzucht in Frankreich angeglichen und auf 35 psu eingestellt. Für Hungerexperimente wurde dieselbe Technik wie bei den Dorschlarven verwendet (2.2.2.3).

Beleuchtungsverhältnisse

Die Beleuchtungsverhältnisse entsprachen denen bei der Dorschlarvenaufzucht.

Wasserdurchflussrate

Die Wolfsbarschlarven wurden zunächst bei stehendem Wasser gehalten. Ab dem 11. Tag nach dem Schlupf mit Beginn der ersten Fütterung wurde das Becken an die Kreisaufgabe der Firma BUTT angeschlossen. Ab dem 25. Tag nach dem Schlupf wurde ein externer Wasserzufluss mit einer Durchflussrate von 3.2l pro Stunde mit Wasser aus der Ostseeleitung zugeschaltet.

Wasserqualität

Die Wasserqualität entsprach den Bedingungen, wie sie bei der Aufzucht von Dorschlarven beschrieben wurde (siehe 2.2.2.3).

Temperatur- und Salzgehaltsverlauf

Temperatur- und Salzgehaltmessungen wurden in dem Becken mit den Wolfsbarschlarven täglich bestimmt. Den Verlauf dieser Parameter zeigt die Abb. 28 im Detail. Der Salzgehalt wurde vom Beginn der Aufzucht bis zum Ende in Stufen abgesenkt, der höchste Wert war 35 psu, der niedrigste Wert wurde am Ende der Aufzucht mit 24psu erreicht. Die Temperatur hatte während der Aufzuchtperiode eine ansteigende Tendenz. Die Werte reichten von minimal 13.2°C bis maximal 20.0°C am Ende der Aufzucht. Als mittlerer Wert wurden 18°C bestimmt.

Futterproduktion

Wolfsbarschlarven können ausschliesslich mit *Artemia*-Nauplien aufgezogen werden, sofern kleinere Sorten von *Artemia*-Nauplien zur Verfügung stehen. Eine Anfütterung mit Rotatorien ist dann nicht erforderlich. Deshalb wurden für diese Experimente zwei verschiedene Nauplien Qualitäten aufgezogen: Als Erstfutter wurden Nauplien mit einer Grösse von 450-475µm erbrütet (Grade I, Gold Label, Firma *Argent*, Produkt "Argentemia, San Francisco Brand"). Diese *Artemia*-Nauplien wurden nicht angereichert sondern stets sofort verfüttert. Für die älteren Wolfsbarschlarven wurden dann grössere Nauplien produziert mit einer Grösse von 500-525 µm (Grade II Silver Label, ebenfalls von der Firma

Argent). Diese *Artemia*-Nauplien wurden 24 Stunden mit *Frippak* (Sanofi Aquaculture, Frankreich) angereichert und dann erst an die Wolfsbarschlarven verfüttert.

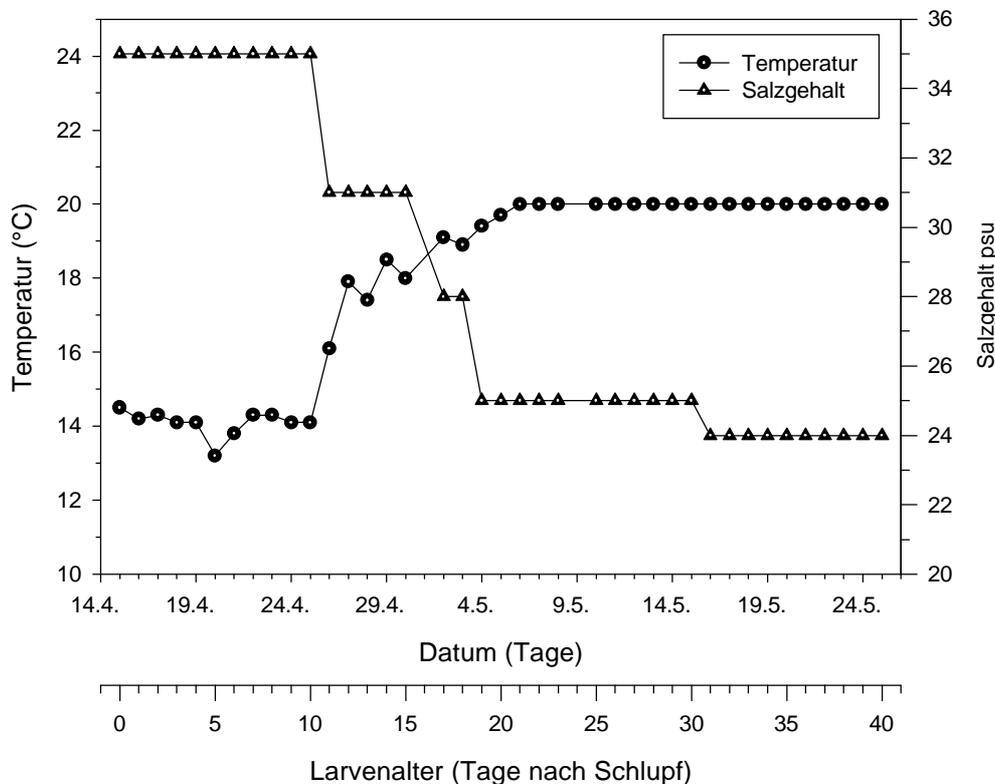


Abb. 28: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf bei der Wolfsbarschlarvenaufzucht 1994. Temperatur und Salzgehalt wurden, bis auf wenige Ausnahmen, täglich gemessen. Die kalendarische Zeitachse veranschaulicht die Jahreszeit, zu der die Experimente durchgeführt wurden.

Fütterungskonditionen

Die Wolfsbarschlarven wurden am 10. Tag nach dem Schlupf erstmalig mit Beginn der Maulöffnung mit kleinen *Artemia*-Nauplien mit einer Futterdichte von etwa 0.5 Nauplien ml⁻¹ gefüttert. Ab dem 23. Tag wurden zusätzlich zu den kleinen Nauplien auch grössere, angereicherte Nauplien mit einer durchschnittlichen Futterdichte von 0.3 kleine Nauplien ml⁻¹ + 1.5 grosse Nauplien ml⁻¹ verfüttert. Ab dem 29. Tag wurden nur noch grosse, angereicherte Nauplien mit einer ansteigenden Futterdichte von 2.5 Nauplien ml⁻¹ bis zu einer Dichte von etwa 8.0 Nauplien ml⁻¹ gegen Ende der Versuche angeboten. Diese hohe Futterdichte war notwendig, um den rasch ansteigenden Energiebedarf der schnellwachsenden Wolfsbarschlarven zu decken.

Probennahme

Gefütterte Wolfsbarschlarven wurden aus dem grossen Tank entnommen. Die Probennahme fand stets vor der täglichen Fütterung statt. Insgesamt wurden 3 Hungerversuche mit derselben Technik wie bei den Dorschlarven durchgeführt. Probennahme und Lagerung

wurden wie bei den Dorschlarven beschrieben durchgeführt. Die Abb. 29 zeigt das Probennahmeschema für die Wolfsbarschlarvenaufzucht 1994.

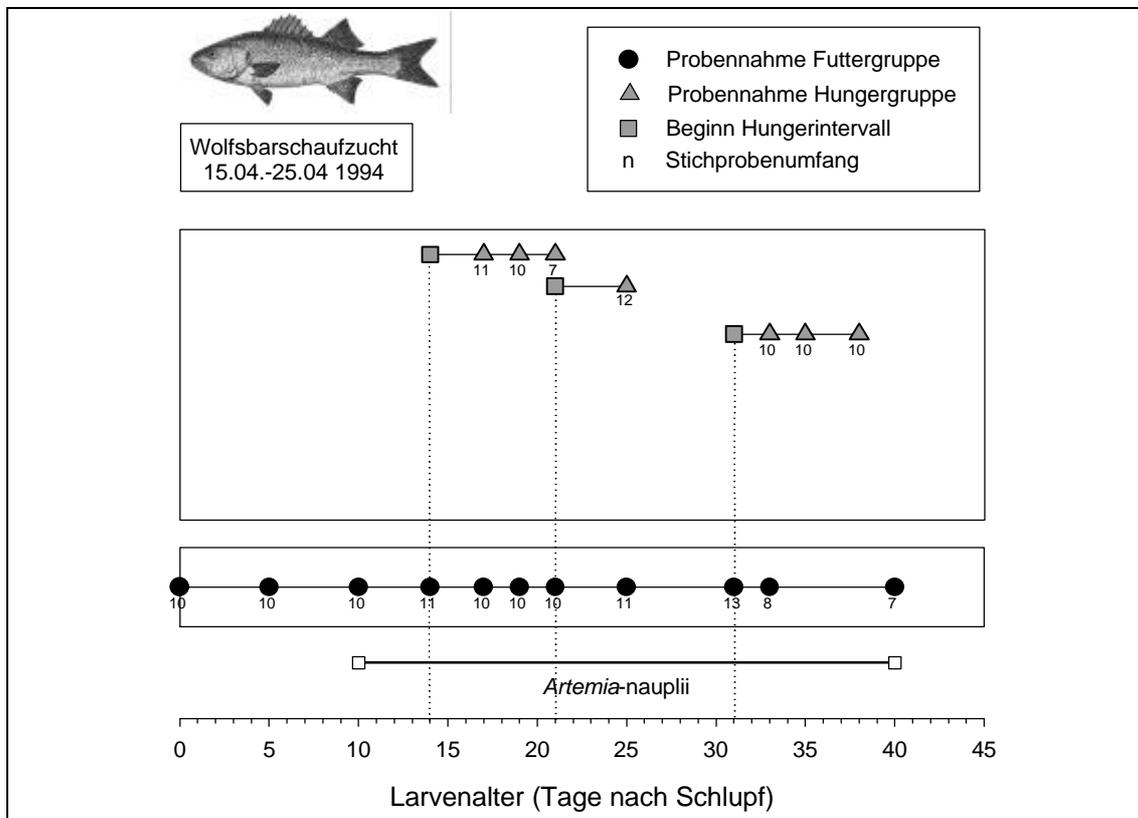


Abb. 29: Probennahmeschema für die Wolfsbarschlarvenaufzucht 1994. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste 40 Tage vom Schlupf bis zur letzten Probennahme. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.

2.2.2.4 Goldbrasse (*Sparus aurata* L.)

Die Versuche mit Goldbrassenlarven wurden im Oktober 1995 in Griechenland durchgeführt. Die befruchteten Goldbrassen-Eier stammten aus dem Laichfischbestand der *Vasni*-Fischfarm (Molos, Griechenland) in deren Anlagen auch die Durchführung der Kalibrierungsexperimente erfolgte. Die aufschwimmenden, natürlich abgelaichten Eier des Laichbestandes von *Sparus aurata* L. wurden von der Wasseroberfläche abgeschöpft und unter natürlichem Tageslicht bei einer konstanten Temperatur von $17.5^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Der Salzgehalt des Seewassers betrug 40psu. Der Wasserzufluß wurde auf 0.2l min^{-1} eingestellt. Drei Tage später erfolgte der Schlupf der Larven. Der Schlupferfolg betrug etwa 80%.

Larvenhälterung

Die Larven wurden in konisch zulaufenden, weissen (2m^3) zylindrischen Becken aufgezogen. Die einen Tag alten Larven wurden mit einer Besatzdichte von ungefähr 15 Larven pro Liter auf die Versuchsbecken verteilt. Für die Hungerexperimente wurde ein schwimmender Eimer mit Gazeboden ($10\mu\text{m}$) benutzt (vergl. mit 2.2.2.3, Dorschlarvenaufzucht). Die Ver-

suchsbecken wurden mit sandgefiltertem (mechanische Rückspülfilter, Korngrößen 0.45 - 0.55 mm und 1.5-2.0 mm) und UV-sterilisiertem Seewasser versorgt.

Beleuchtungverhältnisse

Bis zum Alter von drei Tagen nach dem Schlupf wurden die Versuchsbecken unbeleuchtet unter natürlichem Tageslicht (25-30 Lux) belassen. Vom 4. Tag an wurde das natürliche Licht durch künstliche Beleuchtung (Leuchtstoffröhren Farbton Tageslicht L, 36 Watt) ersetzt. Die Lichtintensität betrug während der Lichtperiode 1200 - 1250 Lux an der Wasseroberfläche. Die Photoperiode wurde auf 24h -Licht eingestellt, ein übliches Verfahren bei der Aufzucht von Goldbrassenlarven.

Wasserdurchflussrate

Die Hälterung der Goldbrassenlarven erfolgte über den gesamten Versuchszeitraum im Durchfluss. Der Wasserfluß durch die Becken wurde von 0.75l min.^{-1} zu Beginn der Versuche auf 1.5l min.^{-1} am Ende des Experimentes erhöht. Die Wassermenge, die den Versuchsbecken pro Stunde zulief, betrug somit am Anfang 2.3%, am Ende 4.5% des Beckenvolumens. Mit Beginn der Fütterung wurde der Filterkorb im Ablauf mit $250\mu\text{m}$ Maschenweite gegen einen mit $106\mu\text{m}$ Gaze bespannten Filterkorb ausgetauscht, um trotz des Wasserdurchflusses den Verlust an Rotatorien möglichst gering zu halten.

Wasserqualität

Sauerstoffgehalt und Sauerstoffsättigung des Beckenwassers wurden täglich morgens vor der ersten Fütterung gemessen. Der Sauerstoffgehalt schwankte zwischen 6.5 und 6.7 mg, die Sättigung bewegte sich auf einem relativ konstanten Niveau zwischen 74 bis 76%. Bakterien (und später auch Fettrückstände aus Futtermitteln) führen zur Ausbildung von Oberflächenfilmen, die eine erhöhte Oberflächenspannung des Beckenwassers bewirken. Diese Oberflächenfilme müssen regelmässig entfernt werden, damit die Larven an der Wasseroberfläche Luft zur erstmaligen Füllung ihrer Schwimmblase schlucken können. Um eine ungehinderte Schwimmblaseninflation zu ermöglichen, wurde die Wasseroberfläche permanent durch sog. Skimmer (ringförmige, auf der Wasseroberfläche schwimmende Kunststoffrahmen) gereinigt, die mittels eines Luftstromes den Oberflächenfilm ansammeln. Insgesamt entsprach die Wasserqualität während der Experimente allen Anforderungen für eine erfolgreiche Goldbrassenlarvenaufzucht.

Temperatur- und Salzgehaltsverlauf

Die Wassertemperatur wurde in beiden Becken von 17.2°C zu Beginn der Experimente langsam auf 22.3°C gegen Ende des Experimentes erhöht, mit einer mittleren Temperatur von 21.3°C . Die Salinität war konstant über den gesamten Versuchszeitraum und betrug 40 psu. Im einzelnen gibt die Abb. 30 Auskunft über den Verlauf von Temperatur und Salzgehalt während des Experiments.

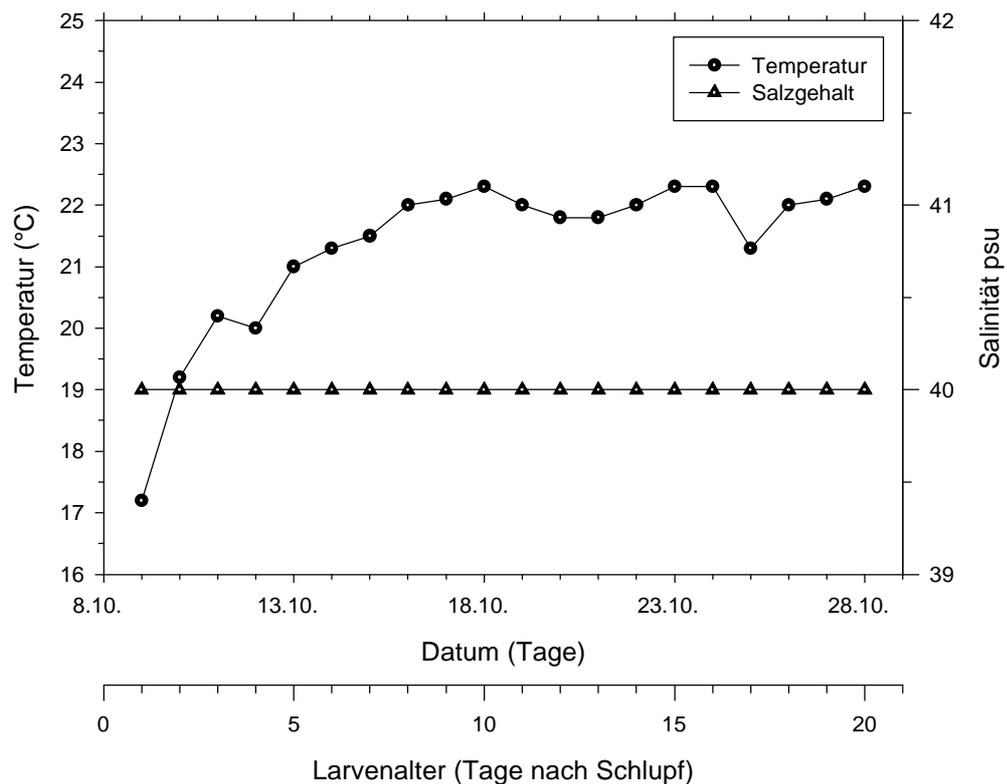


Abb. 30: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf bei der Goldbrassenlarvenaufzucht 1995. Temperatur und Salzgehalt wurden täglich gemessen. Die kalendarische Zeitachse veranschaulicht die Jahreszeit, zu der die Experimente durchgeführt wurden.

Futterproduktion

Für die in diesen Experimenten betrachtete Altersgruppe sind Rotatorien das Hauptfutter, erst ab etwa dem 22. Tag können *Artemia*-Nauplien an Goldbrassenlarven verfüttert werden. Da dieses Alter bei den Kalibrierungsexperimenten nicht erreicht wurde, brauchten für die Aufzucht nur Rotatorien bereitgestellt zu werden. Zu diesem Zweck wurden Rotatorien mit Grünalgen (*Chlorella*) gefüttert und dann mit *Protein-Selco* (*Artemia* Systems, Belgien) angereichert.

Fütterungskonditionen

Am 2-3 Tag nach dem Schlupf kann erstmalig mit der Rotatorienfütterung begonnen werden. Bei diesen Versuchen wurde zu Beginn der Aufzucht eine Dichte von 3-5 Rotatorien ml^{-1} bis zum 8. Tag nach dem Schlupftermin eingestellt, danach wurde die Dichte auf 5-10 Rotatorien ml^{-1} erhöht. Je nach Ausgangskonzentration der Algenkulturen wurden zusätzlich 30-60l einer Grünalgensuspension (*Chlorella*) in die Versuchsbecken gegeben ("Green Water"-Technik).

Probennahme

Die Probennahme fand stets vor der täglichen Fütterung am Vormittag statt. Gefütterte Goldbrassenlarven wurden direkt aus einem der grossen Versuchsbecken entnommen. Insgesamt wurden vier Hungerversuche mit derselben Hälterungstechnik wie beim Aufzuchtexperiment mit Dorschlarven durchgeführt. Die Eppendorf-Reaktionsgefässe mit den Larvenproben wurden dann während der Dauer des gesamten Experiments in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach Abschluss der Aufzuchtexperimente wurden die Larven auf Trockeneis in das IfM transportiert, wo sie bis zur Analyse bei -74°C in einer Tiefkühltruhe gelagert wurden. Die Abb. 31 zeigt das Probennahmeschema für diese Goldbrassenaufzucht.

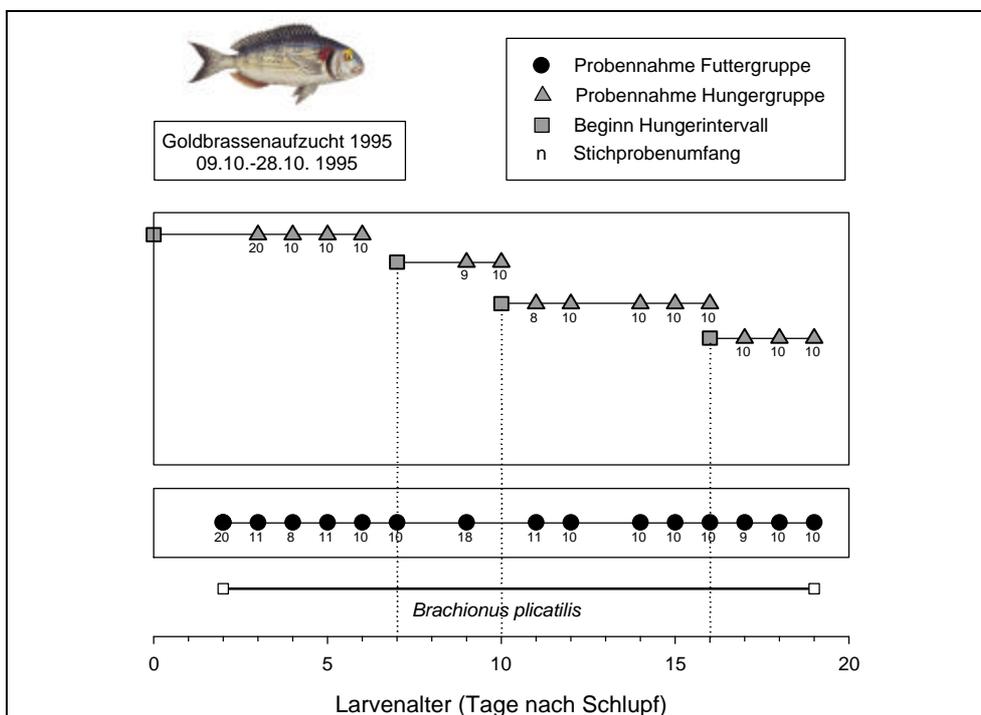


Abb. 31: Probennahmeschema für die Goldbrassenaufzucht 1995. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste vom Schlupf bis zur letzten Probennahme 19 Tage. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.

2.2.2.5 Brasilianische Sardine (*Sardinella brasiliensis* Steindachner 1879)

Die Experimente mit Larven der Brasilianischen Sardine wurden im November 1995 in der Meeresbiologischen Forschungsstation der Universität São Paulo in Ubatuba durchgeführt. Die Aufzuchtversuche wurden in eine Zeit gelegt, in der die Brasilianischen Sardinen vor der Südostküste Brasiliens natürlicherweise ablaichen. Die Eier wurden in dem Gebiet zwischen Santa Marta Grande und dem Cabo Frio mit Hilfe der Forschungsbarkasse der Station gesammelt. Dazu wurde ein Hensen-Netz mit einem Durchmesser von 0.8m und einer Länge von 2m eingesetzt, die Maschenweite war $333\mu\text{m}$. Das Netz wurde vertikal von der Oberfläche bis zu einer Tiefe von maximal 3m für 5-10min. mit 1-2 Knoten gezogen. Die

gefundenen Eier wurden an Bord in 20l Eimern gehältert, belüftet und dann in das klimatisierte Labor (ca. 23°C) transportiert.

Zur weiteren Entwicklung wurden die Eier vom Rest des Planktons separiert, in kleine Glasaquarien mit Seewasser (23-25°C, 33 psu) überführt und schwach belüftet. Da die Eier bei dem natürlichen Salzgehalt von etwa 33 psu in der Wassersäule schweben, war dieses Verfahren unproblematisch. In diesen Glasaquarien schlüpfen die Larven dann nach etwa 24 Stunden.

Larvenhaltung

Die frischgeschlüpften Sardinenlarven wurden auf mehrere 20 und 60l-Glasaquarien verteilt, deren Seitenwände mit schwarzer Folie beklebt waren. Da nach früheren Erfahrungen mit sehr hohen Mortalitätsraten schon nach ein bis zwei Tagen gerechnet werden musste, wurden keine Larvendichten berechnet. Nach dem ersten Tag waren bereits etwa 70% der Larven tot. Die Aquarien wurden mit grossen Luftblasen ohne Ausströmer schwach belüftet um eine mechanische Beschädigung der empfindlichen Sardinenlarven zu vermeiden. Ein Teilwasserwechsel wurde täglich durchgeführt, dabei wurden auch die toten Larven und andere organische Verschmutzungen vom Boden abgesaugt. Das für die Aufzucht verwendete Seewasser wurde direkt aus der vor der Station liegenden Bucht gepumpt, über einen biologischen Filter geleitet und in einer Filterkaskade (*Kuno*-Filter, 5µm und 2µm) gereinigt, bevor es in die Aquarien gefüllt wurde. Für Hungerversuche wurden 10l-Plastikeimer, deren Böden durch eine angeklebte Gaze mit einer Maschenweite von 50µm ersetzt waren, in grosse Rundbecken mit einem Durchmesser von 1.15m und einem Volumen von etwa 830l freischwimmend eingesetzt.

Beleuchtungverhältnisse

Der klimatisierte Raum, in dem die Experimente stattfanden, wurde vom Tageslicht abgeschirmt. Über den Aquarien waren seitlich angebrachte Leuchtstoffröhren (60cm, 30 Watt), die für ausreichende Belichtung sorgten. Die Beleuchtung wurde in einem 18 Stunden Licht-/6 Stunden Dunkelrhythmus über Schaltuhren gesteuert. Die Beleuchtungsstärke wurde nicht bestimmt.

Wasserdurchflussrate

Sämtliche Experimente wurden in 20l und 60l fassenden Glasaquarien mit stehendem Wasser durchgeführt. Täglich wurde aber mindestens ein Drittel des jeweiligen Aquarienvolumens ausgetauscht.

Wasserqualität

Die Sauerstoffsättigung (WTW-Sauerstoffsonde) der Nitrit/Nitrat- und Ammoniumgehalt (MERCK-Testkits) sowie der pH-Wert wurden täglich bestimmt. Die Sauerstoffsättigung

schwankte zwischen 75 und 80%. Die übrigen Messwerte erreichten während der gesamten Experimente keinen kritischen Wert (Blaxter 1981).

Temperatur- und Salzgehaltsverlauf

Die Temperatur (elektronisches Thermometer) und der Salzgehalt (Refraktometer) wurden täglich bestimmt. Der Salzgehalt veränderte sich während der Zeit der Experimente nicht und lag konstant bei 33 psu. Die Temperatur schwankte trotz der Klimatisierung zwischen 21.3° und 25.3°C mit einem Mittelwert von 23.0°C.

Die Abb. 32 gibt Auskunft über den genauen Verlauf der Temperaturschwankungen während der Versuche.

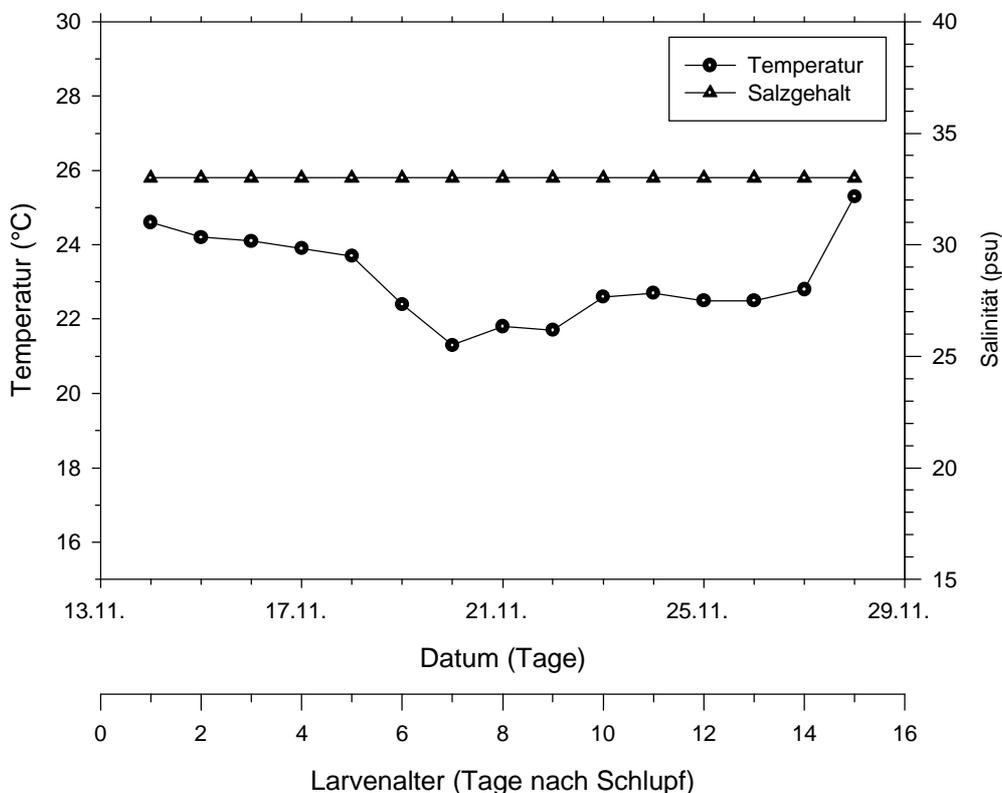


Abb. 32: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf bei der Sardinienlarvenaufzucht in Brasilien 1995. Temperatur und Salzgehalt wurden täglich bestimmt. Die kalendarische Zeitachse veranschaulicht die Jahreszeit, zu der die Experimente durchgeführt wurden.

Futterproduktion

Bei diesen Experimenten wurden ausschliesslich Rotatorien (*Brachionus plicatilis*) an die Larven verfüttert. Die Rotatorien wurden in hängenden Plastiksäcken (Volumen etwa 20l) in leichter Abänderung zu dem in der Firma BUTT praktiziertem Verfahren (Quantz & Witt, pers. Mitteilung) gezüchtet. Als Rotatorienfutter wurden, ebenfalls in Plastiksäcken, Grünalgen (*Tetraselmis tetraethelle*) unter natürlichen Lichtverhältnissen gezüchtet. Die

Rotatorien wurden etwa zwei Stunden vor der Verfütterung an die Sardinenlarven in einem 10l-Eimer konzentriert und unter Belüftung mit *Protein Selco* (*Artemia Systems*, Belgien) angereichert.

Fütterungskonditionen

Da die Entwicklung der Sardinenlarven unter den gegebenen hohen Temperaturen sehr rasch verläuft, wurde bereits am ersten Tag nach dem Schlupf mit Rotatorien angefüttert. Die Sardinenlarven wurden zweimal am Tag, um 12 und 18 Uhr, mit angereicherten Rotatorien gefüttert. Die Futterdichten konnten durch die kleinen Hälterungsvolumina durchgehend auf dem hohen Niveau von 10-20 Rotatorien ml⁻¹ gehalten werden.

Probennahme

Die Probennahme wurde stets morgens vor der ersten Fütterung durchgeführt. Gefütterte Sardinenlarven wurden mit Bechergläsern aus den Glasaquarien entnommen. Proben von hungrigen Larven wurden aus den für diese Versuche präparierten Eimern entnommen. Insgesamt wurden 5 Hungerversuche durchgeführt. Die Eppendorf-Reaktionsgefäße mit den Larvenproben wurden während der Dauer des gesamten Experiments in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach Abschluss der Aufzuchtexperimente wurden die Larven auf Trockeneis in das IfM transportiert, wo sie bis zur Analyse bei -74°C in einer Tiefkühltruhe gelagert wurden. Die Abb. 33 zeigt das Probennahmeschema für diese Sardinenlarvenaufzucht.

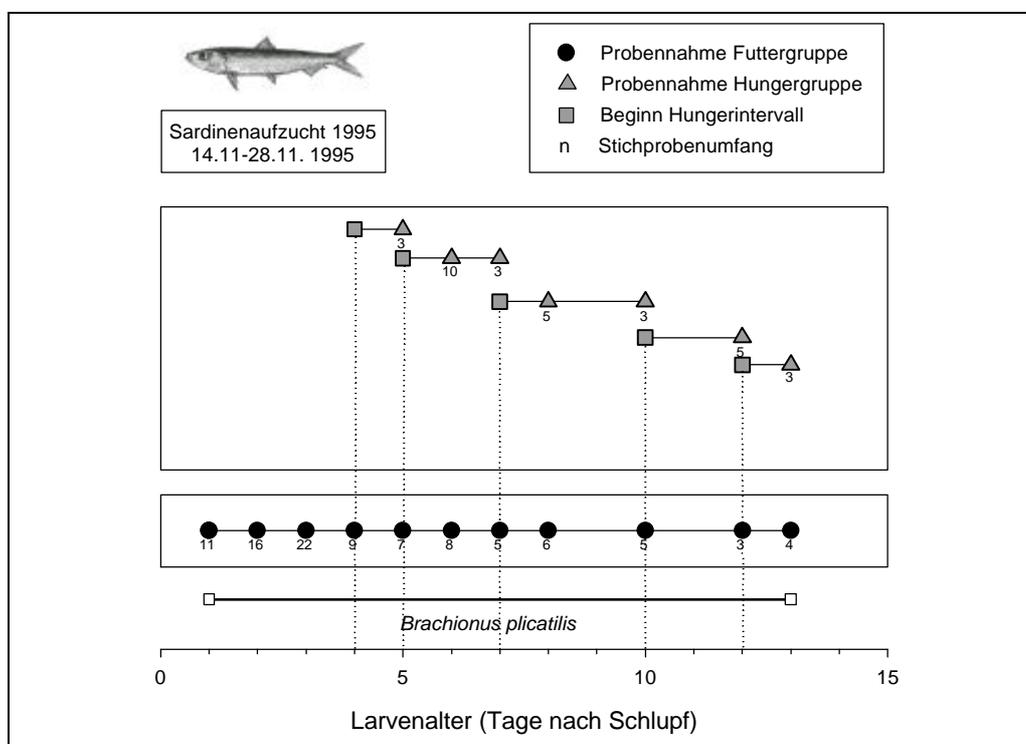


Abb. 33: Probennahmeschema für die Sardinenlarvenaufzucht 1995 in Brasilien. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste vom Schlupf bis zur letzten Probennahme 14 Tage. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.

2.3 Fischlarven aus Feldproben

Heringslarven aus folgenden nahrungsökologisch unterschiedlich zu bewertenden Gebieten wurden miteinander untersucht und verglichen: Larven von herbstlaichenden Heringen aus dem Orkney-Shetland und Hebriden-Gebiet, Larven von winterlaichenden Heringen aus dem Englischen Kanal, Larven von frühjahrslaichenden Heringen aus der Schlei und dem Nord-Ostsee-Kanal. Mit lebend gefangenen Heringslarven aus der Schlei wurden einige Laborexperimente durchgeführt.

Aus einem Projekt zur Rekrutierungsproblematik bei clupeiformen Fischen in der Nordsee stammt der Vergleich der Kondition von Sprottenlarvenkohorten über eine gesamte Laichsaison. Bei diesem Projekt konnten auch die natürlichen, tagesrhythmischen Änderungen der Trypsinaktivität untersucht werden

Von einer Driftstation im Atlantik vor der spanischen Nordwestküste stammen Sardinenlarven, bei denen ebenfalls die tageszeitabhängige Trypsinaktivität über einen Zeitraum von 48 Stunden beobachtet werden konnte.

Die Kondition einiger Dorschlarven aus dem Bornholmbecken/Ostsee sowie von Larven der Brasilianischen Sardine wurden stichprobenartig mit den jeweiligen Laborkalibrierungen dieser Arten verglichen.

Aus einer Zusammenarbeit mit dem Danish Institute for Fisheries (Charlottenlund, Kopenhagen) ergab sich die Möglichkeit, die Kondition und Fressaktivität einer Kohorte von im Feld gefangenen Schellfischlarven zu untersuchen.

Im folgenden Abschnitt wird die Herkunft der Feldproben näher beschrieben.

2.3.1 Heringslarven (*Clupea harengus* L.)

Die Larven des herbstlaichenden Bestandes in der südlichen Nordsee wurden im Rahmen der jährlichen Routineuntersuchung des Internationalen Rates für Meeresforschung (ICES Larvensurveys) zur Heringslarvenzählung während einer Reise mit F.S. "Anton Dohrn" vom 18.01. bis zum 29.01.1986 in der südlichen Nordsee (Flämische Bucht, Stat. 98) gefangen. Die Larven des herbstlaichenden Bestandes wurden während einer Reise mit F.S. "Poseidon" vom 04.09. bis zum 28.09.1986 im Seegebiet um die Orkney, Shetland und Hebriden Inseln gefangen (Stat. POS 510, 511 und 703). Die Heringslarven wurden auf beiden Reisen mit einem vertikal fangenden "Helgoländer Larvennetz" (HLN) mit 300 µm Maschenweite und einem vertikal fangenden Mehrfachschliessnetz, dem MOCNESS gefangen, das mit Netzen mit einer Maschenweite von 335µm ausgerüstet war (Wiebe et al. 1976). Sofort nach dem Fang wurden die Heringslarven in einen Eimer mit gekühltem Seewasser überführt, vom übrigen Plankton getrennt, je 10-20 Larven in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit Seewasser überführt und dann in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die gesamte Holdauer

wurde jeweils unter 10 min. gehalten, die Bearbeitungszeit an Bord wurde auf 15-20 min. begrenzt. Nach der Rückkehr der Forschungsschiffe wurden die Proben bis zu der Analyse in einer Tiefkühltruhe bei -74°C gelagert.

Die Heringslarven im Nord-Ostseekanal wurden mit Unterstützung der Forschungsbarkasse "Sagitta" (IfM-Kiel) im Mai bei Breiholz (Kanalkilometer 50, Salzgehalt 3.2psu) mit einem Bongonetz mit einer Maschenweite von $300\mu\text{m}$ gefangen. Diese Larven wurden genauso behandelt wie bei den oben beschriebenen Seereisen.

Eine Karte zeigt die geographische Lage der Stationen für die hier beschriebenen Fanggebiete einschliesslich des Nord-Ostsee-Kanals (Abb. 34).

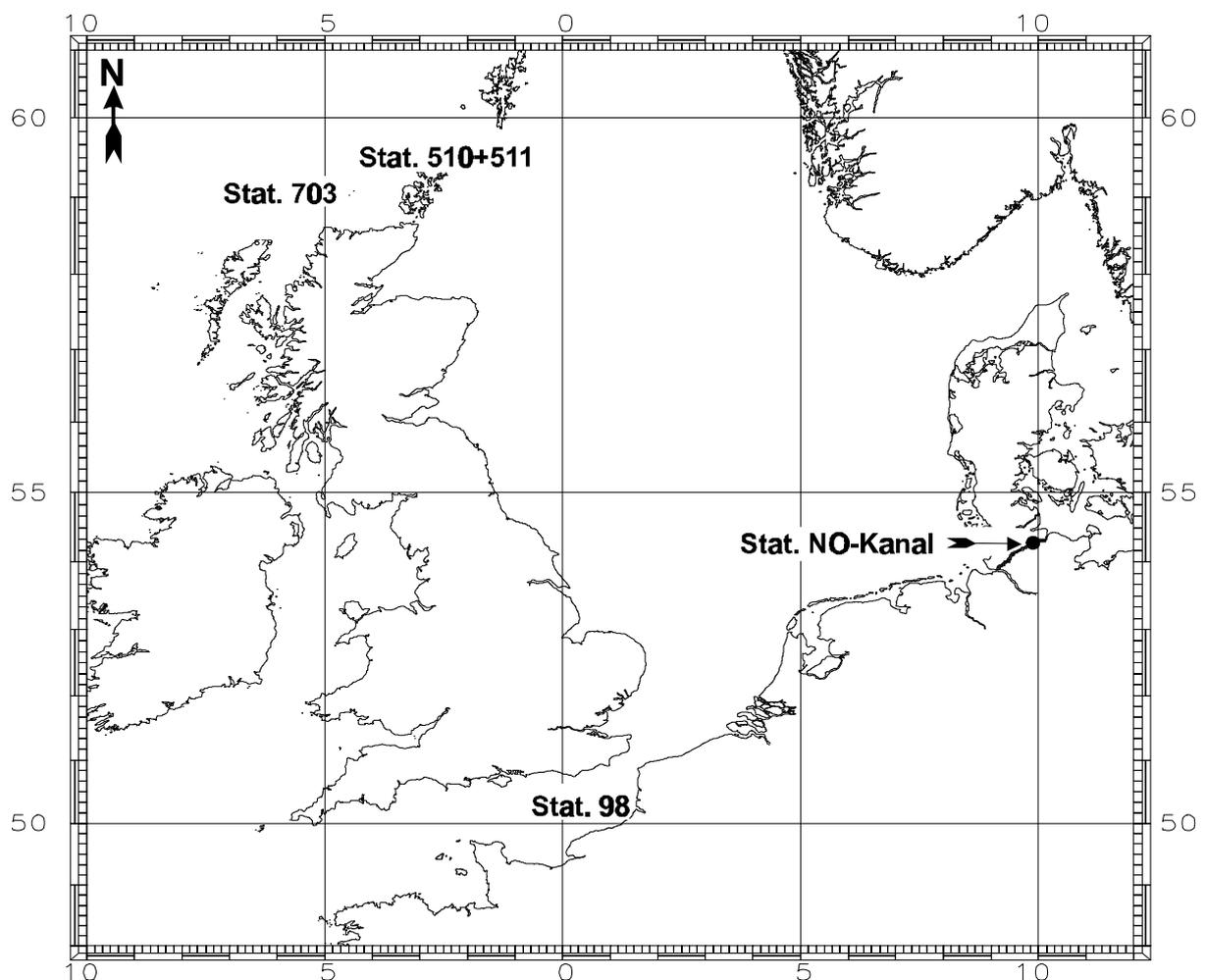


Abb. 34: Geographische Lage und Logbuchnummern der für biochemische Untersuchungen befischten Stationen während der 132. Reise von F.S. "Poseidon" (Stat. 510, 511, 703) und der 146. Reise von F.S. "Anton Dohrn" (Stat. 98). Die Position im Nord-Ostseekanal ist ebenfalls vermerkt.

Die Heringslarven in der Schlei wurden am 01.06.89 und 07.06.89 in der Nähe von Lindau- nis im begeharen Flachwasserbereich mit einer modifizierten Köderfischsenke (1m² Netz- fläche) mit einer Maschenweite von 300 µm gefangen. Diese Larven konnten zum grossen Teil am Leben erhalten werden und wurden im Labor in einigen Experimenten verschiede- nen Bedingungen ausgesetzt.

2.3.2 Sprotten (*Sprattus sprattus* L.)

Im Rahmen eines EU-Projektes wurden umfangreiche Felduntersuchungen an Sprotten in der Nordsee durchgeführt. Dazu wurden während der gesamtem Laichsaison der portions- laichenden Sprotte von Mai bis August 1991 insgesamt 5 Reisen mit F.S. "Victor Hensen" in die Deutsche Bucht durchgeführt. Bei allen Reisen wurde ein festes Stationsnetz abgefah- ren und je nach Situation (Larvenabundanz, Wetter) eine Driftstation durchgeführt. Die Sprottenlarven wurden mit einem HAI-System mit modifiziertem Netzbecher zur Schonung der Larven (vergleichbar mit einem GULF-III System) mit einer Netzmaschenweite von 335 µm gefangen. Die Zuggeschwindigkeit betrug 4-5 Knoten, so dass auch grössere Larven gefangen werden konnten, die Holzzeit wurde auf maximal 15 min. begrenzt.

Das Ziel bei den Driftstationen war die Verfolgung und stündliche Probennahme aus einer bestimmten Larvenkohorte über mindestens 24 Stunden um den natürlichen, tageszeitab- hängigen Rhythmus bei der Futteraufnahme und den damit verbundenen Trypsinaktivitäten zu untersuchen. Dazu wurden jeweils Wasserkörper, in dem hohe Larvenabundanzen fest- gestellt wurden, mit einem geeigneten Driftkörper markiert (Driftboje), über einen Zeitraum von 24 bis zu 36 verfolgt und Hols im Stundenrhythmus durchgeführt.

Die geographische Lage des Stationsgrids in der Deutschen Bucht und die Lage der Driftstationen, deren Ergebnisse in dieser Arbeit gezeigt werden, sind in Abb. 35 dargestellt.

Nach dem Fang wurden die Sprottenlarven in einem Eimer mit Eiskühlung zwischengehäl- tert, vom übrigen Plankton getrennt, je 10-20 Individuen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäss pipettiert und dann in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Beendigung der jeweiligen Reisen wurden die Larven bis zur biochemischen Analyse in einer Tiefkühltruhe bei -74°C gelagert.

Die Darstellung der gesamten Ergebnisse aus diesem multinationalen Projekt ist nicht Ge- genstand dieser Arbeit, aber die Präsentation und Diskussion einiger Teilergebnisse in die- ser Arbeit soll demonstrieren, wie mit Hilfe von regelmässigen Konditionsmessungen in Felduntersuchungen die Überlebenschancen eines Fischlarvenjahrgangs abgeschätzt wer- den können.

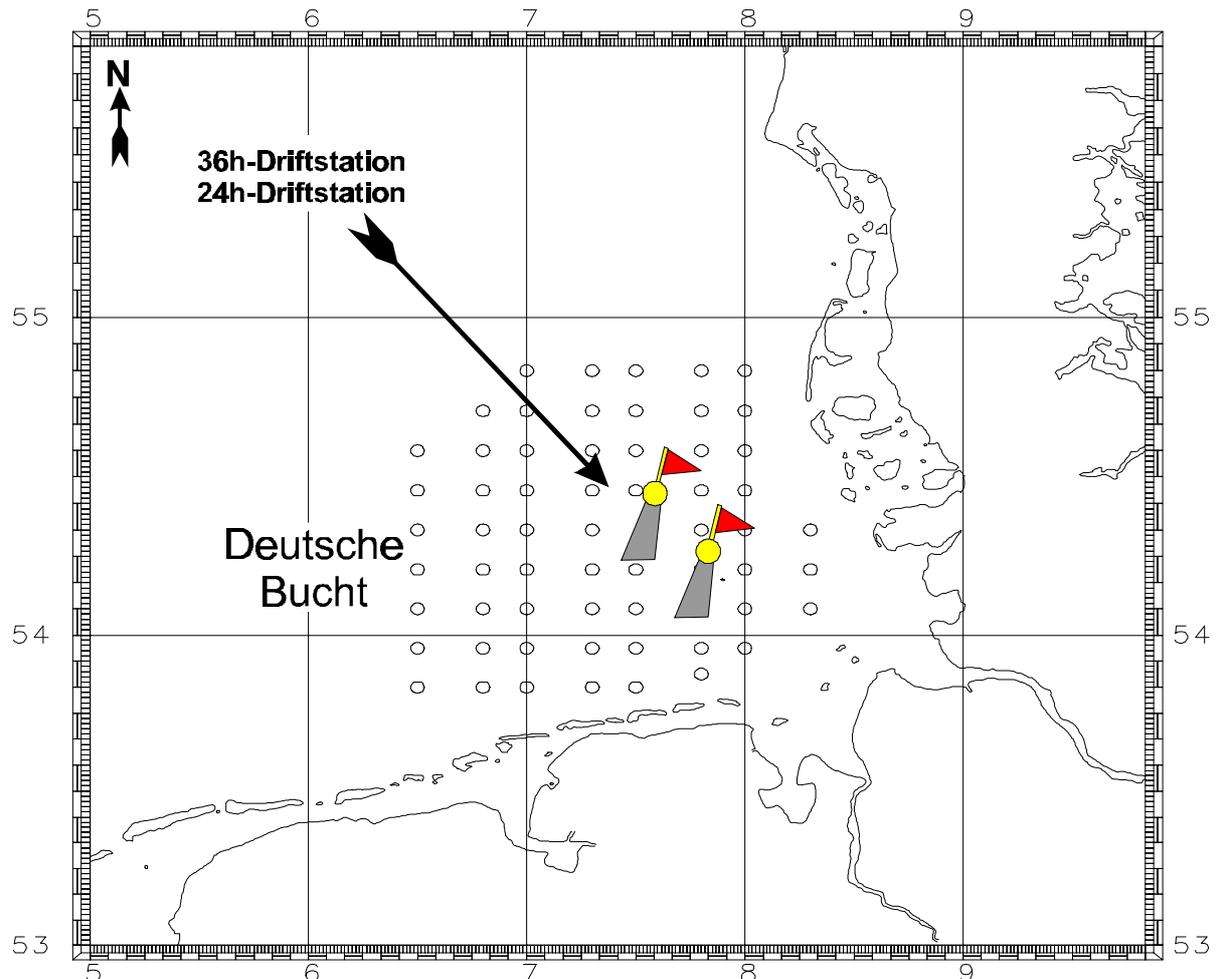


Abb. 35: Geographische Lage des regelmässig beprobten Stationsnetzes im Zusammenhang mit einem EU-Projekt zur Untersuchung der Rekrutierungsprozesse bei clupeiformen Fischen. Der Ausgangspunkt der für diese Arbeit relevanten Driftstationen ist ebenfalls markiert.

2.3.3 Sardinen (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792)

In dem unter 2.2.2 erwähnten EU-Projekt wurden auch Konditionsmessungen an Sardinienlarven aus einem Laichgebiet vor der spanischen Nordwestküste durchgeführt. Aus diesem Teil der Untersuchungen die mit F.S "Valdivia" vom 04.05. bis zum 25.05.1992 durchgeführt wurden, werden in dieser Arbeit die Ergebnisse von einer Driftstation über 48 Stunden, die nach dem unter 2.3.2 bei den Sprottenlarven beschriebenen Muster durchgeführt wurde, gezeigt und diskutiert.

Die Fangtechnik und Behandlung der Proben erfolgte nach dem Muster wie es für die Sprottenlarven bereits beschrieben wurde (vergl. mit 2.3.2).

2.3.4 Dorsch (*Gadus morhua* L.)

Die in dieser Arbeit untersuchten Dorschlarven wurden während einer Forschungsreise mit F.S. "Poseidon" im Mai 1988 im Bornholmbecken gesammelt und stammten von einer dort laichenden Dorschpopulation. Zweck dieser Anwendung war es, die Laborkalibrierungen für

Dorschlarven exemplarisch auf Feldproben anzuwenden. Die Dorschlarven wurden mit dem MOCNESS (vergl. 2.3.2) gefangen und dann wie unter 2.3.2 beschrieben behandelt.

2.3.5 Brasilianische Sardine (*Sardinella brasiliensis* Steindachner 1879)

Die Feldproben der Brasilianischen Sardine sind eine Unterprobe aus einem Routineüberwachungsprogramm (OPISS: Oceanografia da Plataforma Interna da Região de São Sebastião, Vega-Pérez 1996) der Universität São Paulo, Instituto Oceanografico, Brasilien. Dieses Routineprogramm dient zur regelmässigen Überwachung der Sardinen- und Anchovy-Laichbestände vor der brasilianischen Südostküste in dem Gebiet zwischen St. Marta Grande und dem Cabo Frio (Valentini & Cardoso 1991). Die hier untersuchten Larven stammten von einer Reise mit dem brasilianischen F.S. "Prof. W. Besnard" im Dezember 1994. Die Sardinenlarven wurden mit dem Bongonetz gefangen (300µm) und nach dem Fang mit derselben Sorgfalt wie unter 2.3.2 beschrieben behandelt. Zweck dieser Untersuchung war die exemplarische Anwendung der Laborkalibrierung auf Larven diese Art aus einer Feldprobe.

2.3.6 Schellfisch (*Melanogrammus aeglefinus*)

Die in dieser Arbeit untersuchten Schellfischlarven stammen von einer EU-Studie (FAIR-CT95-0084⁴). Die Studie wurde von F.S. "Dana" in der nördlichen Nordsee in einem Gebiet östlich der Shetland Inseln im Mai 1996 durchgeführt. Als Fanggerät wurde ein Mehrfachschliessnetz mit 5 m² Netzöffnung und einer Maschenweite von 1500 µm eingesetzt. Gesammelt wurde in 3 Tiefen, die Larven für diese Arbeit stammten aus Tiefenhorizonten zwischen 25-50 m und von 50 m bis zum Boden. Die Bearbeitungszeit der Proben an Bord wurde auf maximal 15 min. begrenzt. Die Schellfischlarven wurden dann wie unter 2.3.2. beschrieben behandelt und zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann innerhalb von 48 Stunden in eine Tiefkühltruhe mit -80°C überführt, wo sie bis zur Analyse gelagert wurden.

2.3.7 Bezugsgrössen für die Trypsinaktivität

Die an einer Fischlarve gemessene Trypsinaktivität kann auf verschiedene Weise mit anderen messbaren Eigenschaften der Larve in Bezug gebracht werden, um den Messwert für die Trypsinaktivität zu objektivieren und vergleichen zu können. Denkbar wären z.B. ein Bezug zum Larventrockengewicht, zum Proteingehalt der Larve (spezifische Aktivität) oder der Bezug zur Larve. Welcher Bezug hergestellt wird, hängt weitgehend vom geplanten Zweck und Ziel einer Untersuchung ab. Messbare Grössen, wie das Trockengewicht oder die spezifische Aktivität (Aktivität zum Proteingehalt) sind als Bezugsgrösse zur Unterscheidung von hungernden und gut ernährten Larven auf der Basis der Trypsinaktivität als Indikator nicht geeignet. Da hungernde Larven sehr schnell an Gewicht verlieren und damit auch der Proteingehalt abnimmt, bleibt ein aus diesen beiden Werten gebildeter Quotient

⁴ FAIR-CT95-0084: Koordinator Mike Heath, Marine Laboratory, Aberdeen, Schottland. Die Schellfischlarven wurden im Rahmen einer Kooperation mit einem Dänischen Partner, (Brian McKenzie), Danish Institute for Fisheries, untersucht.

eventuell etwa gleichgross und lässt keine Aussage über den Zustand der Larve zu. Die Problematik der Bezugsgrösse für Enzymaktivitäten wurde in Beziehung zum Ziel der Aussage über ein Aktivitätsassay bei Ueberschär (1985) ausführlicher untersucht. Für die bei den Laborkalibrierungen ermittelten Trypsinaktivitäten wird in dieser Studie jeweils der Bezug zum Larvenalter und der Larvenlänge hergestellt.

Um die im Labor gewonnenen Erkenntnisse und Kalibrierungsdaten auf Fischlarven aus Feldproben zur Beurteilung des Ernährungszustands anzuwenden, muss eine gemeinsame Bezugsgrösse für Labor- und Feldlarven in Verbindung mit der Trypsinaktivität festgelegt werden. Diese Bezugsgrösse muss berücksichtigen, dass die Trypsinaktivität als Indikator für die Kondition vom Entwicklungsstand der Fischlarven abhängig ist, gleichzeitig soll sich diese Bezugsgrösse aber bei hungernden Larven nicht wesentlich verändern. Ausserdem muss die Bezugsgrösse bei Feldlarven leicht zu ermitteln sein, um den Aufwand für routinemässige Anwendungen so gering wie möglich halten zu können. Eine Altersbestimmung über die Analyse von Otholithen ist zu aufwendig, zudem ist das Alter als Bezugsgrösse auch aus anderen Gründen ungeeignet. Fischlarven zeigen typischerweise eine steigende Variabilität in der Larvenlänge mit zunehmendem Alter, was gleichbedeutend ist mit unterschiedlichen Entwicklungsstadien bei gleichem chronologischen Alter. Die Trypsinaktivität ist bei den hier untersuchten Arten bis zur Metamorphose in erster Linie vom Entwicklungsstand der Larven und nicht so sehr vom Alter abhängig. Vor diesem Hintergrund würde das Alter als Bezugsgrösse unter anderem zu einer Verfälschung bei der Anwendung des Indikators führen. Als gut geeignete Bezugsgrösse hat sich dagegen die Larvenlänge erwiesen. Dies gilt besonders bei Arten, die eher ein auf die Länge gerichtetes Wachstum (allometrisches Wachstumsmuster) zeigen, wie z.B. Herings- und Sprottenlarven. Bei solchen Arten ist über die Längenmessung eine besonders gute Trennschärfe zwischen gefütterten und hungernden Larven zu erreichen. Die Länge ist ohne grossen Aufwand bei der Inspektion der Larven vor der Analyse mit hinreichender Genauigkeit (hier: 0.5 mm) zu messen und wird durch eine Hungerperiode nicht wesentlich beeinflusst. Falls Schrumpfungsprozesse während der Behandlung und Konservierung der Fischlarven auftreten, so sind diese durch die Gleichbehandlung aller für diese Arbeit analysierten Fischlarven bei der Gefrierkonservierung von untergeordneter Bedeutung. Aus diesen Gründen wird in dieser Arbeit bei der Beurteilung der Kondition von Fischlarven aus Feldproben die Larvenlänge als Bezugsgrösse verwendet.

3 Ergebnisse

Für diese Studie wurden etwa 10.000 Fischlarven von insgesamt 9 Arten aus individuell analysiert. Die Larven von 6 Fischarten wurden im Labor unter kontrollierten Bedingungen aufgezogen, aus Feldstudien wurden Larven von 6 Arten untersucht, wobei für 3 Arten eine Laborkalibrierung zur Beurteilung der Kondition herangezogen werden konnte.

Die individuelle Analyse der Kondition war die Voraussetzung, um die in dieser Studie formulierten Fragestellungen beantworten zu können. Dazu wurde eine fluoreszenzphotometrische Methode auf der Basis konventioneller Methoden zur Enzymaktivitätsmessung entwickelt, mit der auch schon bei den jüngsten Stadien mariner Fischlarven individuell die Trypsinaktivität und damit der Ernährungszustand sowie die Fressaktivität bestimmt werden kann.

Wegen der grundlegenden Bedeutung des biochemischen Analyseverfahrens der Trypsinaktivitäten für diese Arbeit wird den Ergebnissen aus den Fischlarvenanalysen der Ergebnisteil zu den Eigenschaften der fluoreszenzphotometrische Methode vorangestellt.

3.1 Biochemische Analytik

3.1.1 Verluste von Enzymaktivität im Larvenhomogenat

Es wurde geprüft, ob während der Präparation des Larvenhomogenats Verluste oder Gewinne an Enzymaktivität auftreten können. Verluste können durch Inaktivierung mittels freigesetzter Inhibitoren (Hjelmeland 1983, 1995) und durch die autokatalytische Hydrolyse von Trypsin auftreten. Ein Gewinn an Enzymaktivität wäre beispielsweise möglich durch Aktivierungsvorgänge von inaktivem Trypsinogen während des Aufschlusses. Diese potentiellen Möglichkeiten zur Verfälschung der Trypsinaktivitätsmessungen wurden an Fischlarvenhomogenaten verschiedener Herkunft überprüft.

Die Abb. 36 zeigt die Ergebnisse für einen sog. "Spikeversuch" mit Steinbuttlarvenhomogenat. Die errechnete Kurve aus der Aktivität des Standardtrypsins zuzüglich der Aktivität des Homogenats zeigt keine signifikante Abweichung ($p < 0.05$, Vergleich der Regressionsgeraden nach Zar 1984) verglichen mit der Kurve aus den Ergebnissen der Aktivität des mit Trypsinstandard "gespikten" Steinbutthomogenats. In diesem Fall ist kein signifikanter Verlust an Enzymaktivität zu erkennen.

Die Abb. 37 zeigt die Ergebnisse aus einem "Spikeversuch" mit Heringslarven aus der Aufzucht. Hier ist eine signifikante Differenz ($p < 0.05$, Regressionsgeradenvergleich) zwischen der errechneten Kurve und den gemessenen Aktivitäten zu erkennen, was einen Verlust an tatsächlicher Aktivität mit zunehmender Trypsinkonzentration bedeutet.

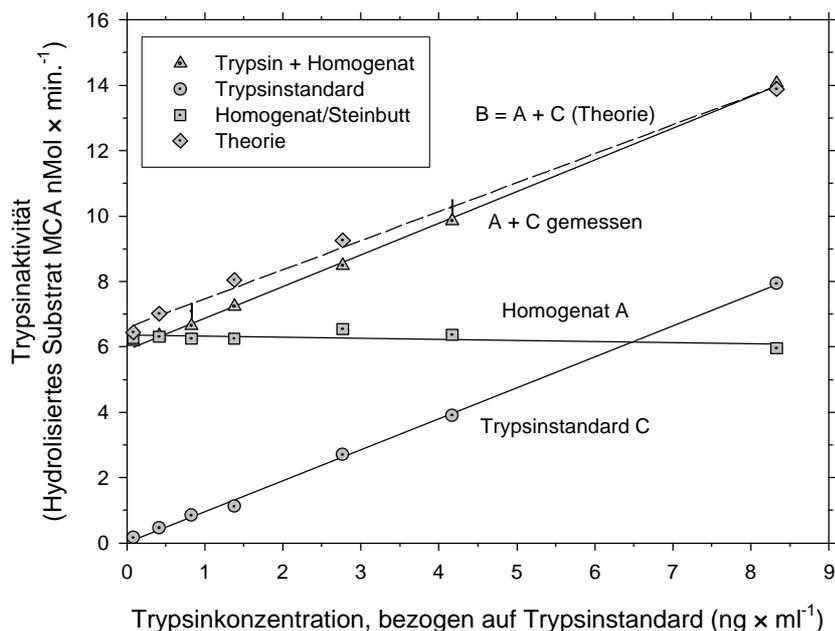


Abb. 36: "Spikeversuche" mit Steinbuttlarvenhomogenat. Bei Übereinstimmung der errechneten Kurve B aus A+C (Theorie) mit der gemessenen Kurve sind keine Verluste oder Zugewinne an enzymatischer Aktivität aufgetreten. Bei Abweichungen nach unten sind Verluste, bei Abweichungen nach oben Gewinne entstanden. Bei diesem Experiment sind keine signifikanten Unterschiede ($p < 0.05$) zur errechneten Kurve zu erkennen. Die Messwerte wurden jeweils an eine lineare Regression angepasst.

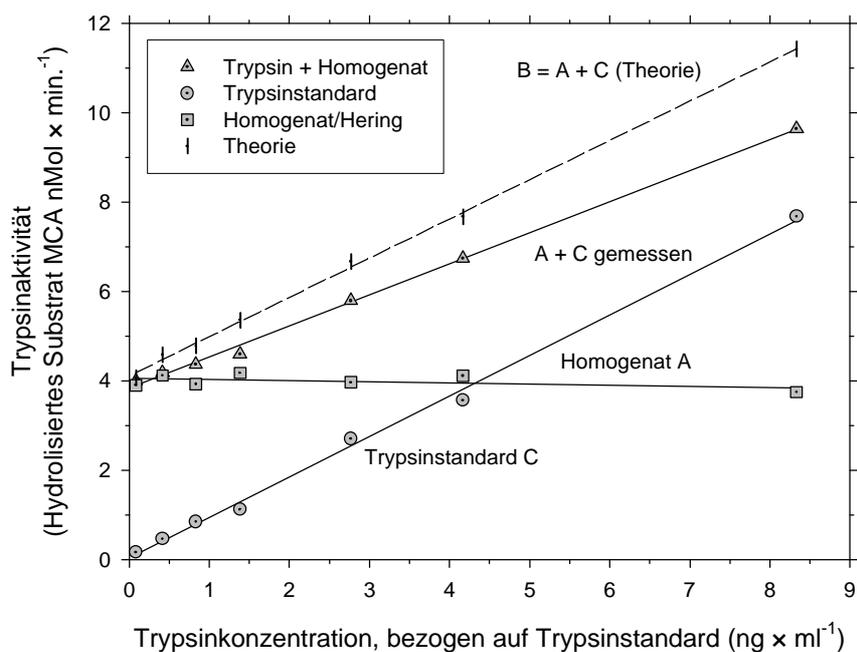


Abb. 37: "Spikeversuche" mit Homogenat von Heringslarven aus der Aufzucht. Erklärungen siehe Abb. 36.

Neben den beiden Homogenaten von Larven aus der Laboraufzucht wurde auch eine Feldprobe von Heringslarven aus der Schlei untersucht. Dabei handelte es sich um bereits sehr grosse Larven (> 20 mm TL), bei denen der Einfluss von Inhibitoren im Homogenat eher zu erwarten wäre als bei den jüngeren Heringslarven aus der Aufzucht. In der Abb. 38 ist zu erkennen, dass zwischen den errechneten und den gemessenen Werten kein signifikanter Unterschied besteht ($p < 0.05$, Regressionsgeradenvergleich nach Zar 1984). Hier ist somit kein Verlust an Aktivität entstanden.

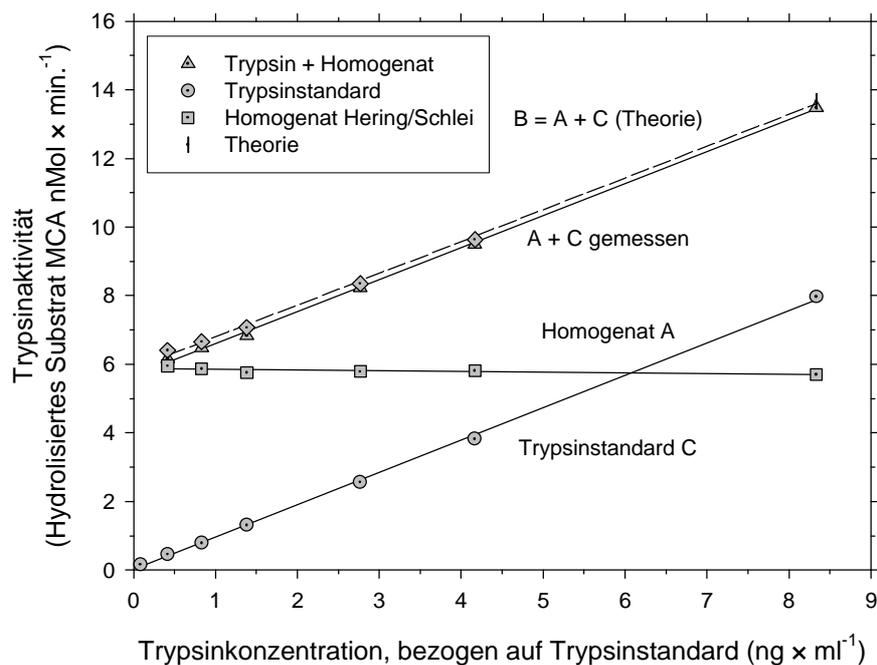


Abb. 38: "Spikeversuche" mit Homogenat von Heringslarven aus Feldproben (Schlei). Erklärungen siehe Abb. 36.

3.1.2 Enzymkinetik: Substratkonzentration und Substrataffinität

Die Geschwindigkeit der Enzymreaktion ist von der Substratkonzentration im Messsystem abhängig. Mit steigender Konzentration wird die Geschwindigkeit grösser, bis sie sich einem Grenzwert nähert. Nach Michaelis-Menten ist eine hyperbolische Abhängigkeit zwischen Umsatzgeschwindigkeit und Substratkonzentration gegeben. Die optimale Substratkonzentration wurde empirisch unter Verwendung von Herings- und Steinbuttlarvenhomogenat sowie Trypsinstandard bei einem pH-Wert von 8.00 und einer Inkubationstemperatur von 30°C ermittelt (vergl. 3.1.3).

Die Abb. 39 zeigt die Zusammenhänge zwischen der Konzentration des Substrates CBZ-L-Arg-MCA und der Umsatzgeschwindigkeit (hydrolysiertes Substrat pro Zeiteinheit). Die Messwerte konnten mit hoher Genauigkeit an Gleichungen zweiten Grades ($y = a + bx + cx^2$) angepasst werden. Dieser Darstellung folgend wurden 0.2 mMol als optimale Substratkonzentration

zentration für den Trypsinstandard ermittelt. Für die Fischlarvenhomogenate ist die optimale Substratkonzentration etwas geringer. Da keine Substrathemmung erkennbar war wurden 0.2 mMolare Substratkonzentrationen für alle Messungen an Fischlarvenhomogenat und Trypsinstandard verwendet. Die Endkonzentration von 0.17 mMol in der Küvette ergibt sich aus der Vermischung der Substratlösung mit jeweils 100µl Larvenhomogenat oder Trypsinstandard bei der Messung.

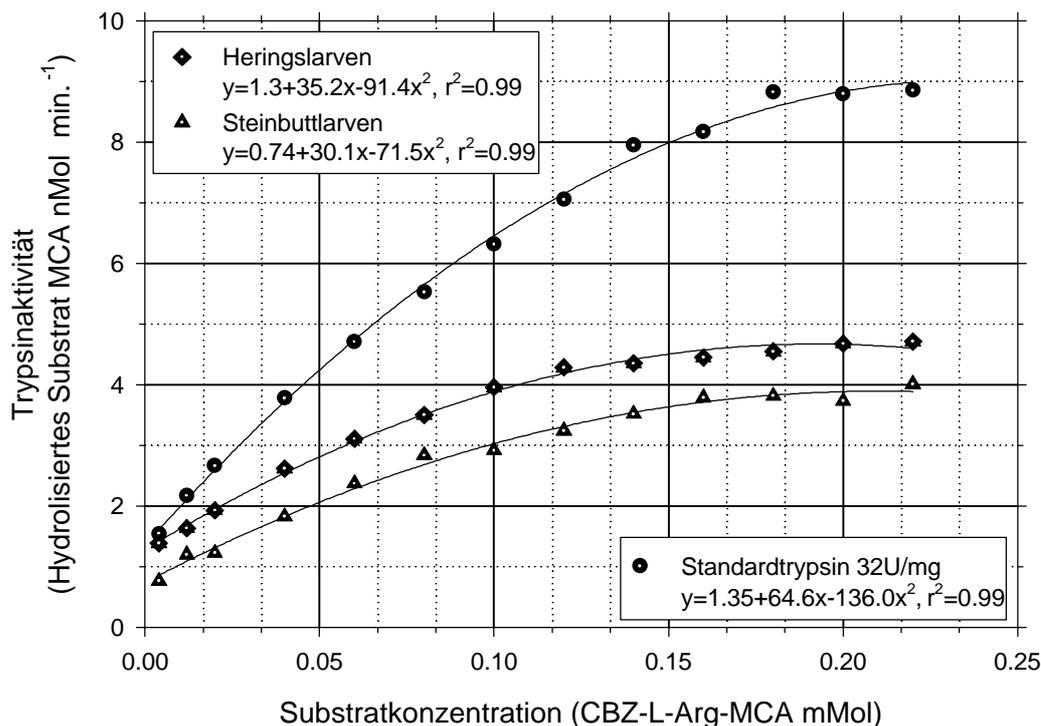


Abb. 39: Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Umsetzungsgeschwindigkeit des Substrates CBZ-L-Arg-MCA mit Trypsin aus Fischlarvenhomogenaten (Herings- und Steinbuttlarven) und Trypsinstandard. Die Messungen wurden bei einem pH-Wert von 8.00 und einer Temperatur von 30°C durchgeführt. Die Messwerte wurden an Gleichungen zweiten Grades angepasst, die Anpassungen sind signifikant ($p < 0.05$).

In Tab. 1 sind die kinetischen Parameter K_m , V_{max} und K_{cat} für die Fischlarvenhomogenate und den Trypsinstandard zusammengestellt. Diese für ein Enzym charakteristischen Größen können zur Berechnung der optimalen Substratkonzentrationen und zum Vergleich der Substrataffinität verwendet werden.

Die Auswertung der kinetischen Parameter zeigt, dass die Substratkonzentration von 0.2 mMol deutlich über der maximalen Sättigungskonzentration vom Standardtrypsin und den

Substrat - Trypsin (Herkunft)	K_m (mMol)	V_{max} (mMol min. ⁻¹)	K_{cat}/sec	K_{cat}/K_m (Mol sec ⁻¹)
CBZ-L-Arg-MCA - Trypsinstandard	0.048	7.49	0.124	2600
CBZ-L-Arg-MCA - Heringstrypsin	0.051	5.40	0.090	1766
CBZ-L-Arg-MCA - Steinbuttrypsin	0.063	5.00	0.083	1323

Tab. 1: Enzymkinetische Parameter für Trypsin aus Herings- und Steinbuttlarven und für ein Standardtrypsin aus Rinderpankreas. Je geringer der K_m -Wert (halbmaximale Substratsättigung) ist, desto höher ist die Substrataffinität. Je höher der Quotient aus K_{cat}/K_m (katalytische Effizienz) ist, desto spezifischer ist ein Substrat für ein bestimmtes Enzym und um so effizienter erfolgt der Substratumsatz. Die Daten gelten für die Standardversuchsbedingungen (30°C, pH-Wert 8.00).

Fischlarventrypsinen liegt. Schwankungen bei der Herstellung des Substrates bis unter die Sollkonzentration beeinflussen die Messungen daher kaum. Aus der *Michaelis-Konstante* K_m

ist weiterhin zu entnehmen, dass die Trypsine aus den Fischlarven eine geringere Affinität zu dem Substrat CBZ-L-Arg-MCA aufweisen als das Standardtrypsin.

3.1.3 Temperatur-, pH-Optimum und Temperaturresistenz

Die Reproduzierbarkeit bei der Bestimmung von Enzymaktivitäten hängt weitgehend davon ab, ob im Temperatur- und pH-Optimum des jeweiligen Enzyms gemessen wird. Ausserdem wird nur dann auch die Empfindlichkeit einer Methode maximal genutzt. Zur Orientierung über die Grenzwerte von Temperatur und pH-Wert bei der Aktivitätsbestimmung von Fischlarventrypsinen wurden Ergebnisse aus früheren Versuchen herangezogen (Uberschär 1985). Da Temperatur und pH-Optimum nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können, wurde eine dreidimensionale Darstellung gewählt (Abb. 40). Die höchsten Aktivitäten wurden bei den diesen Daten zugrundeliegenden Versuchen bei einer Temperatur von 50°C und einem pH-Wert um 8.00 gemessen.

Auf der Basis dieser Ergebnisse mit einem konventionellen chromogenen Substrat wurden die Versuche zur Optimierung der Fluoreszenzanalytik durchgeführt. Der Temperatureinfluss auf die Geschwindigkeit des Substratumsatzes wurde an einer Standardtrypsinlösung und an dem Trypsin aus Heringslarvenhomogenat bei Temperaturen von 21°C bis 42°C geprüft. Die Aktivität des Trypsinstandards steigt bis zur höchsten Inkubationstemperatur fast linear an. Das Fischlarvenhomogenat zeigt bereits bei Temperaturen über 35°C Denaturierungserscheinungen. Die Autohydrolyserate des Substrates steigt mit der Temperatur an, zeigt aber besonders ab 30°C eine deutliche Zunahme (Abb. 41).

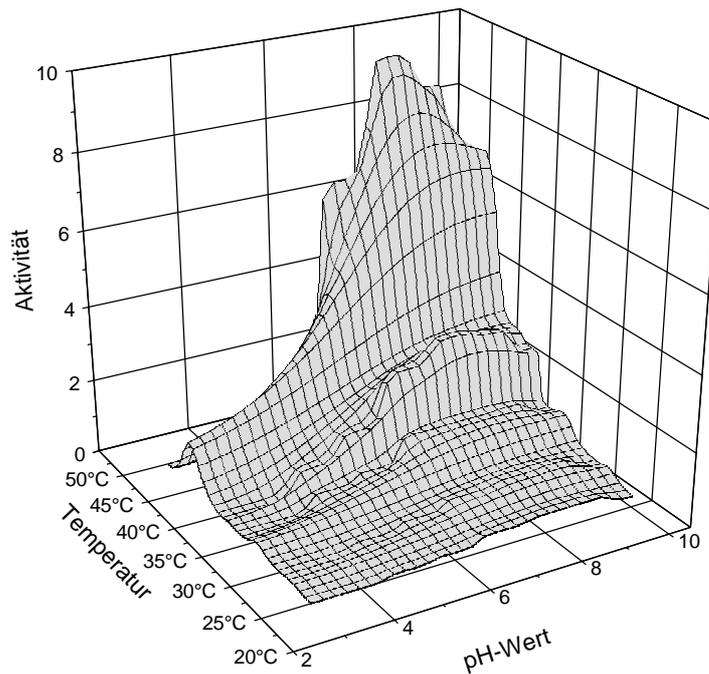


Abb. 40: Die Aktivität von Fischlarventrypsin in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert. Substrat: Na-Benzoyl-L-Arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid (L-BAPNA) bei 405 nm, neu gezeichnet nach Daten von Ueberschär (1985).

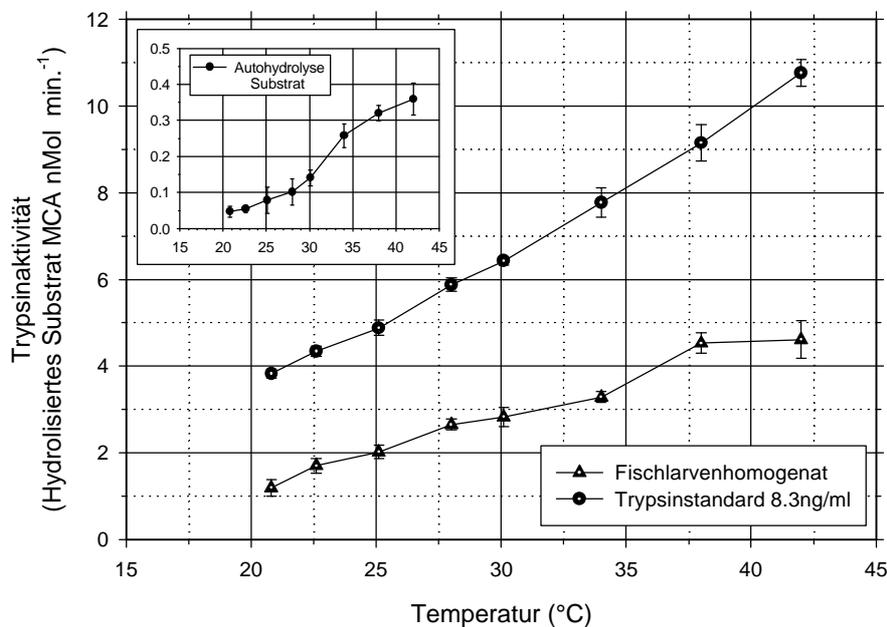


Abb. 41: Der Einfluss der Inkubationstemperatur auf die enzymatische Aktivität von Standardtrypsin und Trypsin aus Fischlarvenhomogenat. Geprüft wurde in einem Temperaturbereich von 21° bis 42°C. Die kleine Abbildung zeigt den Einfluss der Temperatur auf die nicht-enzymatische Hydrolyse (Autohydrolyse) des Substrates CBZ-L-Arg-MCA (die Einheiten sind identisch mit denen der grossen Abbildung). Die Messpunkte sind Mittelwerte von 3 Parallelmessungen mit Standardabweichung.

Der Einfluss des pH-Wertes wurde unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus Vorversuchen (siehe Abb. 40) erst ab pH 6 geprüft. Sowohl der Trypsinstandard als auch das Fischlarvenhomogenat zeigen ein Maximum an Aktivität bei einem pH-Wert um 8.0. Die Autohydrolyse des Substrates steigt über einem pH von 8.0 stark an (Abb. 42).

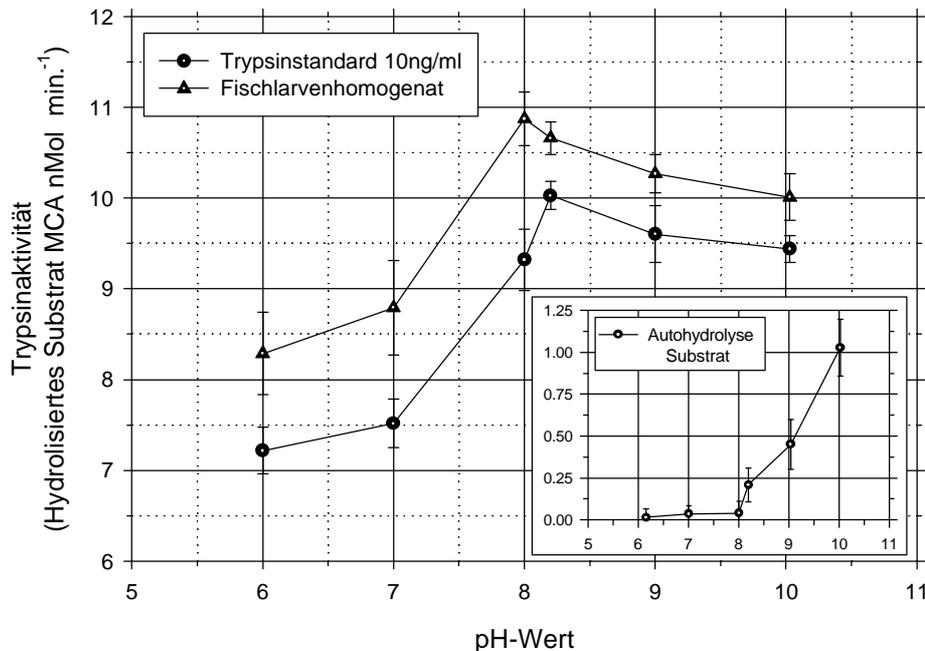


Abb. 42: Der Einfluss des pH-Wertes auf die enzymatische Aktivität von Standardtrypsin und Trypsin aus Fischlarvenhomogenat. Geprüft wurde bei pH-Werten von 6 - 10. Die kleine Abbildung zeigt den Einfluss des pH-Wertes auf die nicht-enzymatische Hydrolyse (Autohydrolyse) des Substrates CBZ-L-Arg-MCA (die Einheiten sind identisch mit denen der grossen Abbildung). Die Messpunkte sind Mittelwerte von 3 Parallelmessungen mit Standardabweichung.

Als Ergebnis aus den Versuchen zur Temperatur- und pH-Optimierung wurden für die Enzymaktivitätsmessungen eine Temperatur von 30°C und ein pH-Wert von 8.00 für alle Messungen ausgewählt. Obgleich sich die Aktivität durch höhere Temperaturen noch steigern liesse, mussten die beginnenden Denaturierungserscheinungen ab 35°C beim Fischlarvenhomogenat sowie die Autohydrolyse des Substrates bei Temperaturen oberhalb von 30°C berücksichtigt werden. Ein weiterer Nachteil bei Temperaturen weit über der üblichen Raumtemperatur sind die lange Anpassungszeit der Probe in der Küvette und die geringere Präzision der Messung durch zufällige Abweichungen von der Solltemperatur.

3.1.4 Interkalibrierung

In einem Interkalibrierungsversuch wurde die Methode zur Trypsinaktivitätsbestimmung mit einem Radioimmunoassay (RIA) verglichen (Ueberschär et al. 1992). Der RIA misst selektiv nur jenes Trypsin, für welches die jeweiligen Antikörper produziert wurden, in diesem Fall nur das Trypsin von Heringslarven. Ferner erfasst diese Methode quantitativ die inaktive

Vorstufe von Trypsin, das Trypsinogen. Diese Zustandsform des Trypsins wird vom Aktivitätsassay nicht gemessen. Die Vergleichsmessungen wurden an 53 Tage alten, hungernen und gefütterten Heringslarven aus der Laboraufzucht durchgeführt. Dabei wurde nicht an einem Ganzkörperhomogenat gemessen sondern an dem herauspräparierten Pankreas sowie am Darmtrakt der Larven.

Die Ergebnisse aus der Bestimmung der Trypsinaktivität und Trypsinquantität im Darm von gefütterten Larven zeigen eine signifikant lineare Beziehung ($p < 0.05$). Auch bei den Larven, die 68 Stunden vor der Probennahme gehungert hatten, lässt sich eine signifikant lineare Beziehung für Aktivität und Quantität zeigen (Abb. 43).

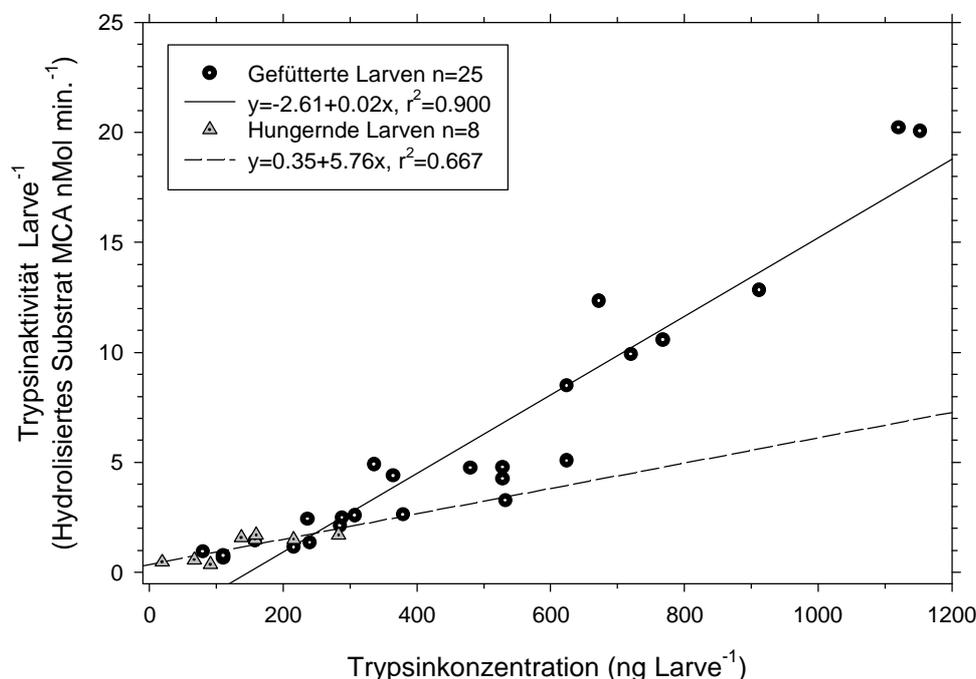


Abb. 43: Ein Vergleich zwischen der Messung der Trypsinaktivität mit der in dieser Arbeit entwickelten Analytik und der Quantität von Trypsin mittels eines Radioimmunoassays im Darmtrakt von 53 Tage alten Heringslarven aus der Aufzucht. Jedes Symbol repräsentiert den Messwert einer Fischlarve. Die hungernden Larven wurden vor der Probennahme 68 Stunden ohne Futter gehalten. Die Regressionsanalyse zeigt eine signifikant lineare Beziehung zwischen den Ergebnissen beider Messverfahren ($p < 0.05$) sowohl für gefütterte als auch für hungernde Heringslarven.

Die Beziehung zwischen der Trypsinaktivität und der Anzahl gefressener Copepodennauplien (*Acartia tonsa*) einerseits sowie die Beziehung zwischen Nauplienanzahl im Darmtrakt und der Trypsinquantität andererseits zeigt Abb. 44. Die Heringslarven in diesem Experiment wurden eine Stunde nach der Fütterung entnommen, wodurch sichergestellt wurde, dass noch keine Nauplien ausgeschieden worden waren (Pedersen 1984). Beide Messverfahren wurden an denselben Homogenaten vom Darmtrakt dieser Heringslarven durch-

geführt Die Regressionsanalyse resultiert in einem linearen Zusammenhang zwischen Nauplienanzahl und Trypsinaktivität einerseits und Nauplienanzahl und Trypsinquantität andererseits.

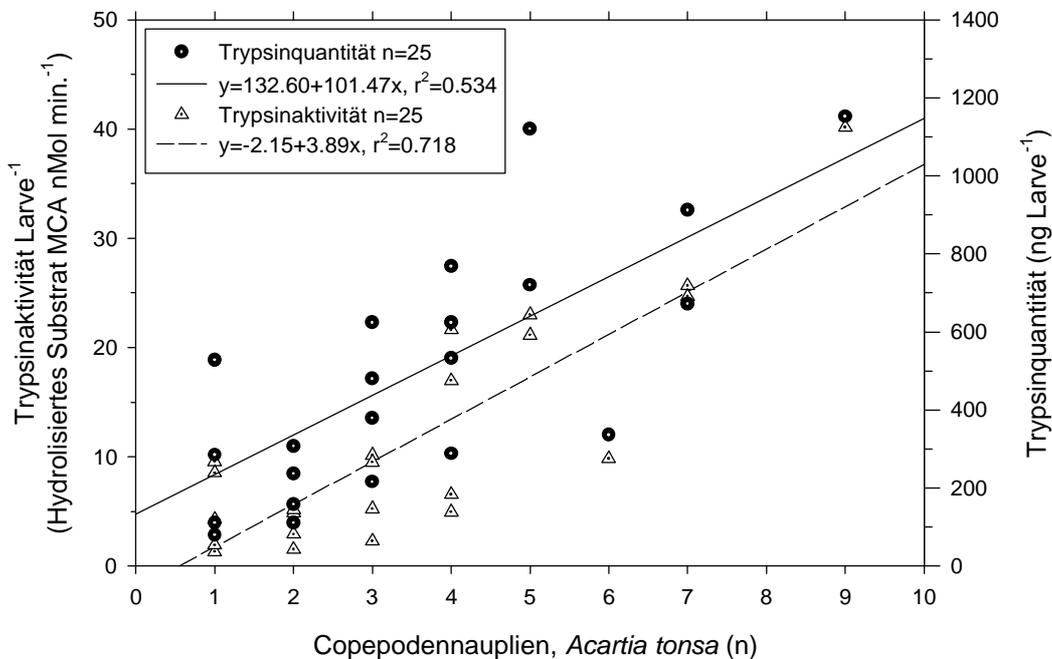


Abb. 44: Die Beziehung zwischen der Nauplienanzahl (*Acartia tonsa*) im Darmtrakt von 53 Tage alten Heringslarven und der Trypsinaktivität respektive der Trypsinquantität. An die Daten wurden jeweils lineare Regressionen signifikant ($p < 0.05$) angepasst.

Bei beiden methodischen Ansätzen ist eine signifikant lineare Korrelation zwischen der Anzahl aufgenommener Copepodennauplien und der Trypsinaktivität bzw. der mittels Immunoassay gemessenen Trypsinquantität gegeben.

Nach der Umrechnung der Trypsinaktivität in Konzentrationswerte für Heringstrypsin können die aus der Regressionsanalyse errechneten Regressionsgeraden direkt miteinander verglichen werden (Abb. 45). Beide Regressionsgeraden haben etwa dieselbe Steigung, sind aber parallel gegeneinander verschoben. Die Prüfung des Achsenabschnitts ergibt einen signifikanten Unterschied ($p < 0.05$ Regressionsgeradenvergleich nach Zar, 1984). Die über die Eichung mit gereinigtem Heringstrypsin aus der Enzymaktivitätsmessung ermittelten Trypsinkonzentrationen sind tendenziell geringer als die über den RIA direkt ermittelten Trypsinkonzentrationen. Dies lässt sich wahrscheinlich damit erklären, dass die Quantitätsmessung auch das Trypsinogen erfasst, welches schon in den Darmtrakt sezerniert aber noch nicht aktiviert wurde. Der parallele Verlauf schließt die Wirkung von Inhibitoren auf die Aktivitätsmessung aus.

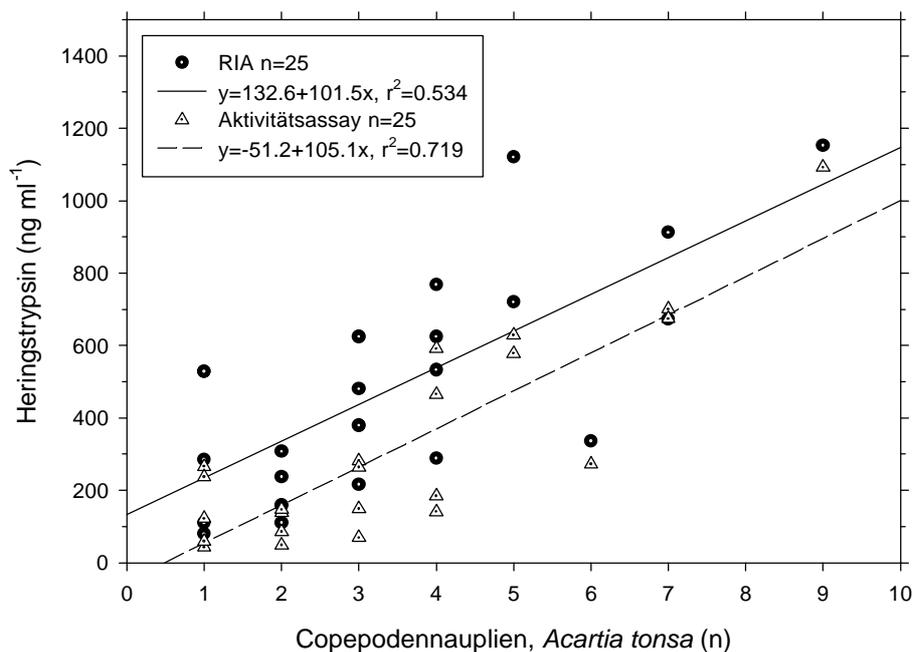


Abb. 45: Die Beziehung zwischen der Anzahl von Copepodennaplien (*Acartia tonsa*) im Darmtrakt von Heringslarven zur direkt gemessenen Trypsinkonzentration über einen RIA und zur errechneten Trypsinkonzentration über den Enzymaktivitätsassay mit Hilfe einer Eichung mit gereinigtem Heringstrypsin. Die Symbole entsprechen individuellen Messungen an einzelnen Heringslarven. Der Vergleich der Regressionsgeraden zeigt einen parallelen Verlauf jedoch signifikante Unterschiede bei den Achsenabschnitten ($p < 0.05$).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die in diesen Heringslarven gemessenen Trypsinaktivitäten im wesentlichen auf Trypsin endogenen Ursprungs zurückzuführen sind, welches in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme und Rationsgrösse sezerniert und aktiviert wird.

3.1.5 Faktorberechnung

Die Faktorberechnung ist der Versuch, ein allgemeingültiges Verhältnis zwischen den jeweiligen Trypsinaktivitätswerten von gefütterten und hungernden Larven zu definieren. Dazu wurden die Messwerte für die Futter- bzw. Hungergruppen der kalibrierten Arten jeweils an eine Regressionsgerade angepasst und zunächst einzelne Quotienten aus den Werten der Regressionsgleichungen für gefütterte und hungernde Larven in Schritten von 0.2 mm Larvenlänge über jeweils den gesamten Längenbereich gebildet. Aus den einzelnen Quotienten wurde dann bei jeder Art ein Mittelwert gebildet und als Faktor der jeweiligen Art definiert:

$$\text{Mittelwert} = \sum_{\substack{\text{kleinste} \\ \text{Länge} \\ \text{grösste} \\ \text{Länge}}} \frac{0.2\text{mm}}{\text{Intervall}} \frac{f(x)_{\text{gefütterte}}(\text{Aktivität})}{f(x)_{\text{gehungert}}(\text{Aktivität})} \cong \text{Faktor}_{\text{Art}}$$

Mit Hilfe eines Tukey-Box-Plots (Tukey 1977) wurden die berechneten Faktoren für die 6 kalibrierten Arten verglichen (Abb. 46) und mit einem Nicht-Parametrischen Test auf signifikante Unterschiede geprüft (Kruskal-Wallis "One-Way-Analyses of Variance on Ranks", $p < 0.05$).

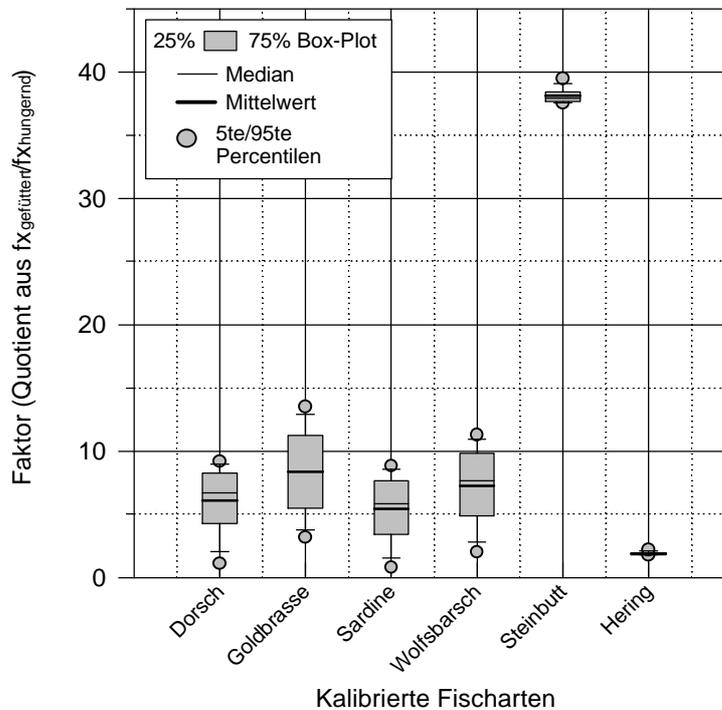


Abb. 46: Aus den Quotienten der Trypsinaktivität für gefütterte und hungernde Larven jeweils einer Art (in 0.2mm Intervallen) wurden Mittelwerte gebildet (die jeweiligen Faktoren der Arten) und als Tukey-Box-Plots dargestellt. Der Mittelwert für die Arten Hering und Steinbutt sind stark unterschiedlich von denen der übrigen Arten.

Bei der Bildung eines generellen Faktors zur mathematischen Beschreibung des Unterschieds bei der Trypsinaktivität von gefütterten zu hungernden Fischlarven ist zu berücksichtigen, dass dieser Unterschied mit zunehmender Länge mehr oder weniger stark scheinbar zunimmt. Die Abb. 47 zeigt den Trend für die Veränderung des Quotienten bei zunehmender Larvenlänge für alle im Labor kalibrierten Arten. Bei Goldbrassen-, Dorsch- und Wolfsbarschlarven wurde ein eher exponentieller Trend bei der Zunahme der Trypsinaktivitäten für gefütterte Larven beobachtet, während die Werte für die Hungergruppen eher einem linearen Trend folgen (vergl. 3.2). Daher muss sich der Quotient mit zunehmender Länge mehr oder weniger stark verändern.

Bei Herings- und Steinbuttlarven ist kaum eine Veränderung zu beobachten, am stärksten ist die Veränderung des Faktors bei Wolfsbarsch, Goldbrasse und beim Dorsch. Bei diesen

Arten ist, wie bereits oben erwähnt, eine eher exponentielle Zunahme bei den Trypsinaktivitäten für die Futtergruppen mit zunehmender Länge zu beobachten.

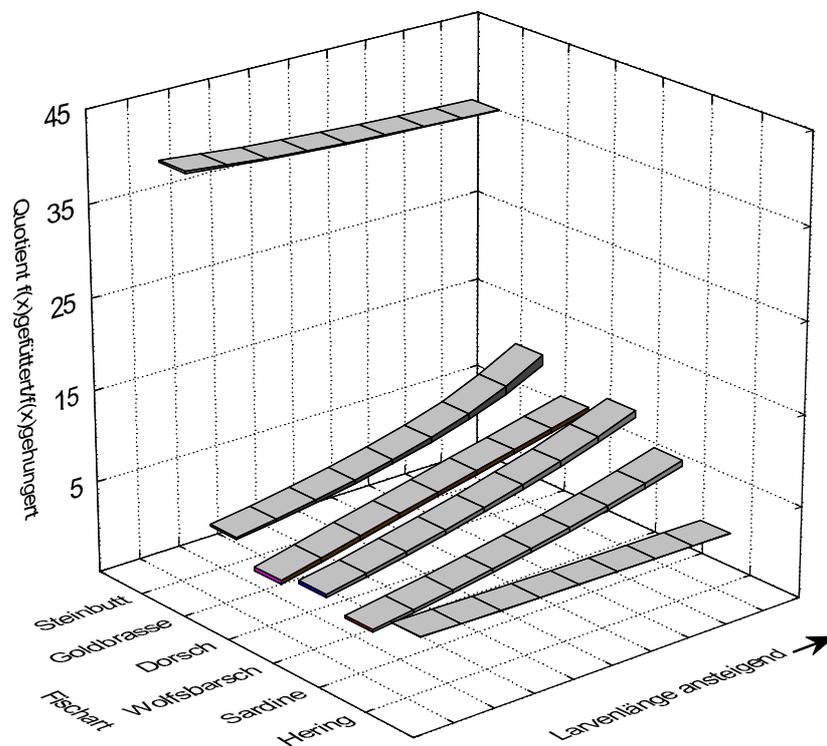


Abb. 47: Veränderung des Quotienten aus der Trypsinaktivität für gefütterte und für hungernde Larven bei den in dieser Arbeit kalibrierten Arten mit zunehmender Länge. Je grösser der Unterschied zwischen den Trypsinaktivitätswerten von gefütterten und hungernden Larven ist, desto stärker steigt der Quotient positiv mit der Länge an und um so ausgeprägter ist die nach oben gerichtete Biegung der Bänder.

Die folgende Matrix (Tab. 2) gibt einen Überblick über die Signifikanzverhältnisse für die errechneten Faktoren aus allen in dieser Arbeit kalibrierten Arten.

Dorsch						
Hering	✓					
Steinbutt	✓	✓				
Goldbrasse	✓	✓	✓			
Wolfsbarsch		✓	✓			
Sardine		✓	✓	✓	✓	
Art	Dorsch	Hering	Steinbutt	Goldbrasse	Wolfsbarsch	Sardine
Faktor	6.08	1.89	38.12	8.36	7.25	5.42

Tab. 2: Die Matrix gibt einen Überblick über die Ergebnisse zum Test auf signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den errechneten Faktoren der 6 kalibrierten Arten. ✓ steht für einen signifikanten

Unterschied, ☒ bedeutet einen nicht signifikanten Unterschied der Mittelwerte. In der letzten Zeile sind die Faktoren für jede Art notiert.

Die Mittelwerte der Quotienten für Herings- respektive Steinbuttlarven unterscheiden sich deutlich von den übrigen vier Arten. Aus den ähnlichen Faktoren von Dorsch, Goldbrasse, Wolfsbarsch und Sardine wurde ein gemeinsamer Mittelwert errechnet und als genereller Faktor bezeichnet. Für die an der Faktorbildung beteiligten Arten, für die sowohl eine Laborkalibrierung vorlag als auch Feldproben untersucht worden waren (Larven der brasilianischen Sardine und für Dorschlarven), wurde die über den Faktor errechnete Anzahl hungernder Larven mit der Anzahl hungernder Larven verglichen, welche unter Anwendung der aus der Laborkalibrierung der jeweiligen Art abgeleiteten Grenzwerte (95%-Vorhersagebereich der Regressionen) ermittelt wurden (vergl. 3.2). Der Faktor für Heringslarven unterscheidet sich stark von den Faktoren der übrigen Arten und wurde nicht bei der Bildung des generellen Faktors berücksichtigt. Bei den Feldproben vom Hering konnte der generelle Faktor daher nicht angewendet werden. Deshalb wurde für die Berechnung hungernder Larven bei Feldproben vom Hering alleine der Faktor verwendet der aus den Quotienten für Heringslarven berechnet worden war. In der Tab. 3 werden die Werte aus der Berechnung hungernder Larven in Feldproben mit Hilfe des Faktors mit den Ergebnissen aus der direkten Anwendung der Laborkalibrierung verglichen.

Die Berechnung über den Faktor führt nicht zu systematisch nach unten oder oben abweichenden Werten. Bei der Größenordnung und im Trend ergibt sich eine Übereinstimmung zwischen den über die Laborkalibrierung direkt ermittelten Zahlen und den mittels der Faktoren errechneten Werten.

Feldprobe	Direktberechnung	Faktorberechnung ⇐ Abweichung ⇒	Anzahl Larven (n)
Hering POS 703	0%	0%	158
Hering POS 510	80.7%	⇐ 50.7%	26
Hering POS 511	36.6%	40.0% ⇒	30
Hering AD 98	27.9%	⇐ 23.2%	186
Hering NO-Kanal	21.6%	⇐ 16.2%	37
Dorsch/Bornholm	30.8%	35.8 ± 4.5% ⇒	13
Sardine/Brasilien	28.6%	34.1 ± 13.9% ⇒	42

Tab. 3: Vergleich des relativen Anteils hungernder Fischlarven in Feldproben verschiedener Arten basierend auf der Berechnung mittels eines Faktors und der Berechnung unter direkter Anwendung der jeweiligen Laborkalibrierung. Die Pfeile deuten die Abweichung der Faktorberechnung nach unten oder oben vom direkt berechneten Wert an. In der rechten Spalte ist die Anzahl individuell analysierter Larven aus der jeweiligen Feldprobe angegeben (n).

3.1.6 Methodenoptimierung

Während der routinemässigen Anwendung der Analytik über mehrere Jahre wurde ständig auch an der Verbesserung der Enzymktivitätsanalytik gearbeitet. So wurden neue Substrate und verspiegelte Spezialküvetten getestet und dadurch Möglichkeiten gefunden, die Empfindlichkeit weiter zu steigern. Diese methodischen Verbesserungen konnten wegen der Vergleichbarkeit der Messungen in dieser Arbeit für die Routinebestimmungen nicht eingesetzt werden, sollen aber an dieser Stelle als Vorschlag zur Optimierung der biochemischen Analytik beschrieben werden.

Spiegelküvetten

Eine technische Möglichkeit, die Empfindlichkeit der Fluoreszenzmessung zu steigern, ist der Einsatz von verspiegelten Küvetten. Dabei sind zwei der optischen Flächen der Küvetten mit Metall bedampft. Die sonst nicht genutzte Fluoreszenz wird dadurch von den Rückseiten der verspiegelten Küvetten in Richtung Detektor reflektiert und so besser ausgenutzt. Abb. 48 zeigt den Unterschied zwischen der Fluoreszenzausbeute für normale und verspiegelte Halbmikroküvetten bei der Erstellung einer Eichkurve mit dem Fluorophor MCA (vergl. 2.1.5). Der Gewinn an Empfindlichkeit entspricht etwa einem Faktor von 2 bis 2.5.

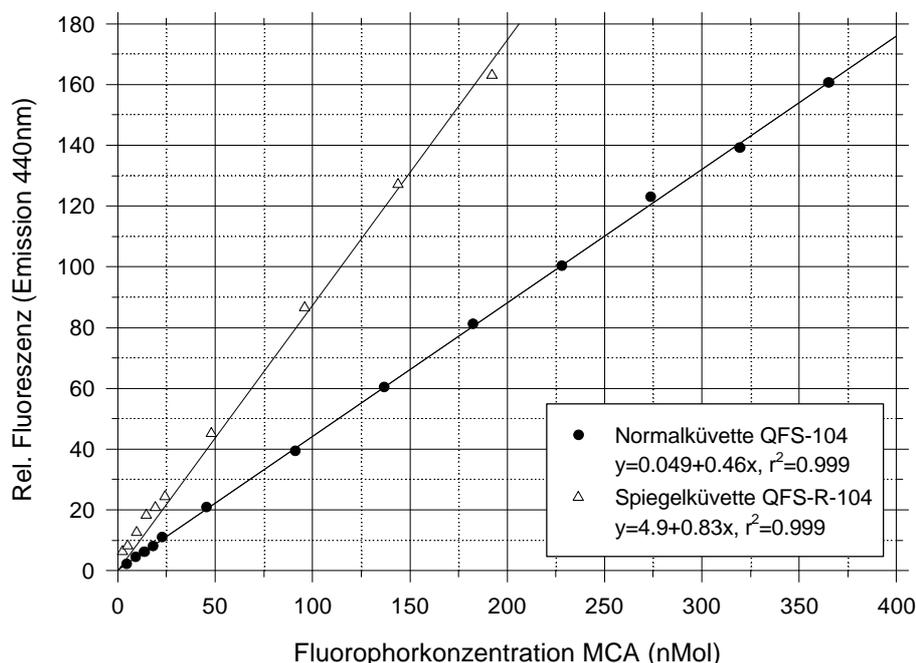


Abb. 48: Unterschied in der Fluoreszenzausbeute beim Vergleich von normalen und verspiegelten Halbmikroküvetten. Getestet wurden ansteigende Konzentrationen des für die Erstellung von Eichkurven verwendeten Fluorophors MCA.

Entsprechend ist bei Enzymaktivitätsmessungen ein Gewinn an Quantenausbeute am Detektor um etwa den Faktor 2.5 zu erreichen. Die Abb. 49 zeigt exemplarisch ein Beispiel für

den Unterschied in der Fluoreszenzzunahme bei der Erstellung einer Eichkurve mit Standard-Trypsin (vergl. 2.1.4) unter Verwendung von Normal- und Spiegelküvetten.

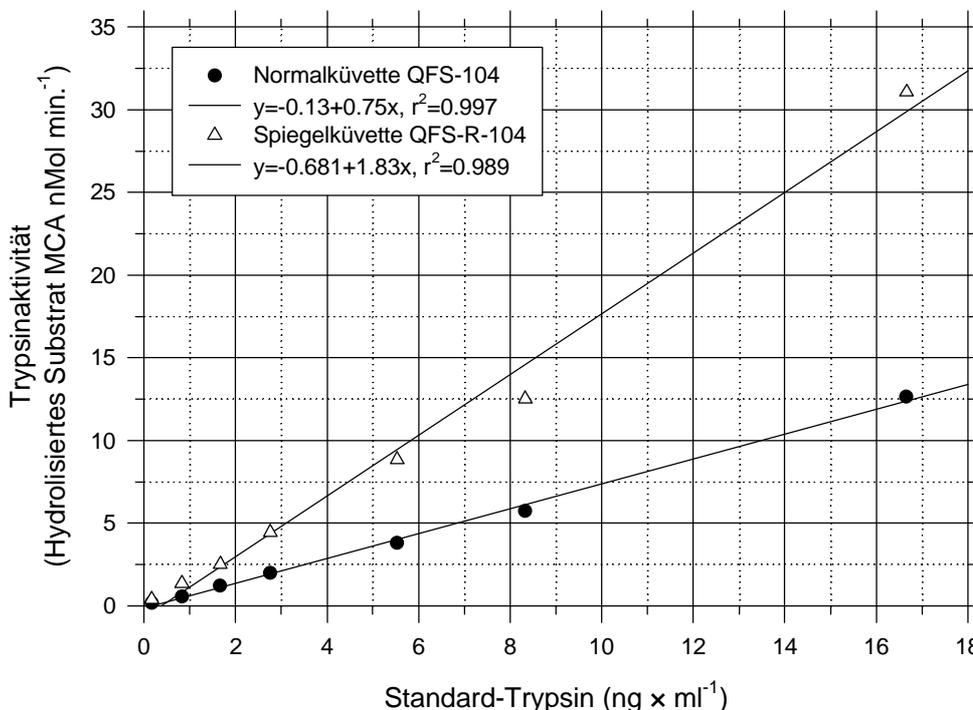


Abb. 49: Unterschiede in der Fluoreszenzausbeute beim Vergleich von normalen und verspiegelten Halbmikroküvetten. Getestet wurde mit einem Trypsinstandard bei verschiedenen Konzentrationen.

Substratauswahl

Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Empfindlichkeit ergab sich aus Experimenten mit verschiedenen Substraten. Es wurde gefunden, dass sich das Substrat BZ-L-Arg-MCA diametral zum Substrat CBZ-L-Arg-MCA verhält, welches für die Routinemessungen in dieser Arbeit eingesetzt wurde. Das Trypsin aus Fischlarven hat zum Substrat BZ-L-Arg-MCA eine höhere Affinität als zum CBZ-L-Arg-MCA, beim Trypsinstandard verhält es sich genau umgekehrt. Daraus ergibt sich für das Substrat BZ-L-Arg-MCA eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit mit Trypsin aus Fischlarven. In der Tab. 4 werden die kinetischen Parameter für beide Substrate verglichen. Die Vergleichsmessungen dazu wurden an Fischlarvenhomogenaten vom Hering und Steinbutt sowie mit Trypsinstandard durchgeführt.

Die Überführung des hyperbolisch verlaufenden Substratumsatzes nach *Michaelis-Menten* in eine grafische Darstellung nach *Lineweaver-Burk* veranschaulicht die in Tab. 4 zusammengefassten kinetischen Parameter und lässt erkennen, dass keine Abweichung von der Linearität der doppelt reziproken Anpassung vorliegt (Abb. 50). Dies zeigt, dass in keiner der getesteten Kombinationen Substrathemmung eine Rolle spielt.

Substrat - Trypsinart (Herkunft)	K_m (mMol)	V_{max} (mMol x min.⁻¹)	K_{cat} x sec⁻¹	K_{cat}/K_m Mol⁻¹ x sec⁻¹
CBZ-L-Arg-MCA - Trypsinstandard	0.048	7.49	0.124	2600
BZ-L-Arg-MCA - Trypsinstandard	0.162	9.01	0.150	927
CBZ-L-Arg-MCA - Heringstrypsin	0.051	5.40	0.090	1766
BZ-L-Arg-MCA - Heringstrypsin	0.027	8.33	0.139	5219
CBZ-L-Arg-MCA - Steinbuttrypsin	0.063	5.00	0.083	1323
BZ-L-Arg-MCA - Steinbuttrypsin	0.027	5.10	0.085	3161

Tab. 4: Vergleich der enzymkinetischen Parameter für das Trypsin aus Herings- und Steinbuttlarven sowie ein Standardtrypsin aus Rinderpankreas für jeweils zwei Substrate. Je geringer der K_m -Wert (halbmaximale Substratsättigung) ist, desto höher ist die Substrataffinität zum jeweiligen Enzym. Je höher der Quotient aus K_{cat}/K_m (katalytische Effizienz) ist, desto effizienter spaltet das Enzym ein bestimmtes Substrat. Alle Messungen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt (30°C, pH-8.00).

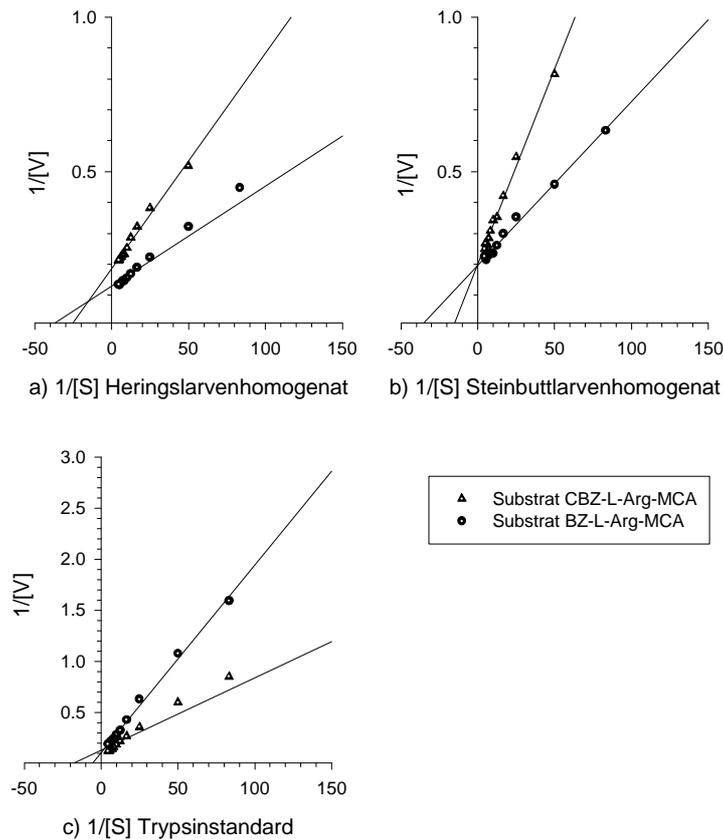


Abb. 50 a-c: Doppelt-Reziproke Darstellung der Michaelis-Menten Kinetik für die enzymkatalysierte Umsatzgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und der Art des Substrates. Getestet wurden 2 verschiedene Substrate (CBZ-L-Arg-MCA und BZ-L-Arg-MCA bei pH.8.00 und 30°C) mit Trypsin aus a) Herings- und b) Steinbuttlarvenhomogenaten sowie c) ein Trypsinstandard (SERVA, 32U mg⁻¹).

Trypsinogenaktivierung

Zur Trypsinogenaktivierung wurden einige exemplarische Aktivierungsversuche mit Trypsinogenstandard und Enterokinase durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Aktivierung von Trypsinogen durch Enterokinase und die Messung des aktivierten Trypsinogens mit der in dieser Arbeit entwickelten Analytik prinzipiell möglich sind (Abb. 51). Die Inkubationsbedingungen entsprachen den Bedingungen bei den Routinemessungen zur Trypsinaktivitätsbestimmung (vergl. 2.1.3).

Als problematisch bei diesen Versuchen wurde gefunden, dass die verwendete Enterokinase in hohen Konzentrationen selbst zur Hydrolyse des Substrates beiträgt. Eine Ursache hierfür können Unreinheiten der Enterokinase sein, die in der verwendeten Qualität noch geringe Mengen Trypsin enthält. Das Trypsinogen alleine dagegen zeigt ein inaktives Verhalten.

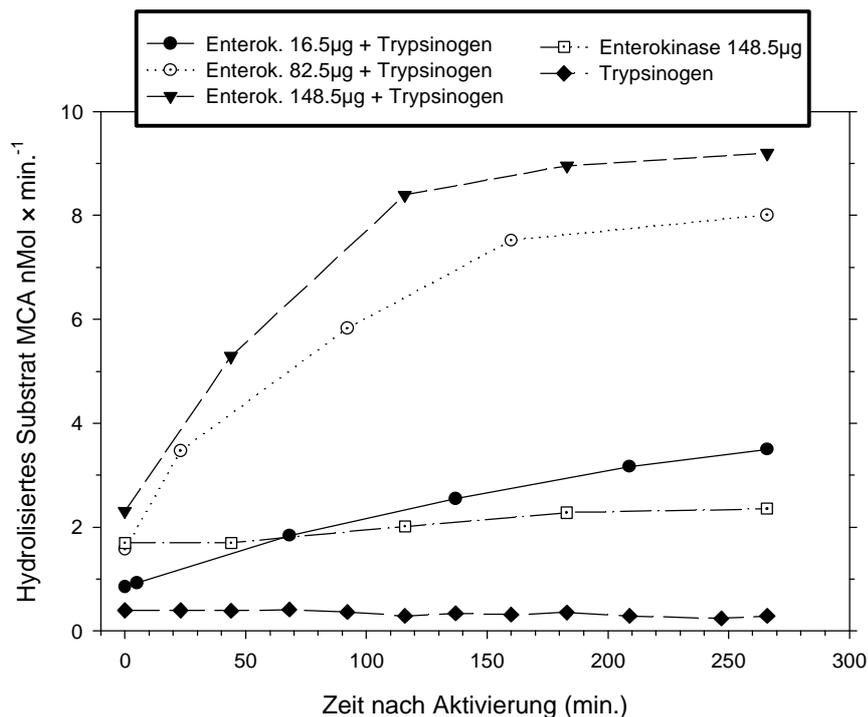


Abb. 51: Aktivierung von Trypsinogen mit verschiedenen Enterokinasekonzentrationen. Substrat CBZ-L-Arg-MCA, pH 8.00, Temperatur 30°C. Die Enterokinasekonzentration bezieht sich auf die Endkonzentration in der Küvette. Zum Vergleich wird das Verhalten des Trypsinogens und der Enterokinase in der höchsten hier eingesetzten Konzentration gezeigt.

3.2 Trypsinaktivitätsbestimmung - Laborexperimente

3.2.1 Vergleich verschiedener Ernährungsbedingungen

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Trypsinaktivitätsmessungen an im Labor unter unterschiedlichen Fütterungsbedingungen aufgezogenen Fischarten (Hering, Steinbutt, Dorsch, Wolfsbarsch, Goldbrasse und brasilianische Sardine) vorgestellt. Mit diesen Laborexperimenten sollte geklärt werden, wie sich die Trypsinaktivitäten bei den Larven unterschiedlicher Fischarten in Beziehung zum Alter und zur Larvengröße entwickeln und wo die wesentlichen Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Arten liegen. Das Ziel dieser Experimente war die Ermittlung von Kalibrierungsdaten, die nach detaillierter Bewertung für Untersuchungen zum Ernährungszustand von natürlich aufwachsenden Fischlarvenkohorten angewendet werden können.

Die Trypsinaktivität wird zunächst jeweils in Abhängigkeit vom Larvenalter dargestellt und dann in Beziehung zur Larvenlänge gesetzt. Ferner wird das Längenwachstum in Beziehung zum Alter bei den im Labor aufgezogenen Larven der verschiedenen Arten betrachtet. Zufällige Abweichungen von der Korrelation zwischen diesen Parametern können Fehler bei der Probenahme aufdecken (z.B. könnten bevorzugt grosse Larven beprobt worden sein). Systematische Abweichungen von einer angepassten Regressionskurve nach oben

oder unten können beschleunigtes Wachstum oder Wachstumsdepression im Zusammenhang mit dem Fütterungsregime oder aufgrund eines ontogenetischen Musters bedeuten. Beobachtungen aus diesen Darstellungen werden im Zusammenhang mit der alters- und grössenabhängigen Entwicklung der Trypsinaktivität betrachtet.

Die Trypsinaktivität bei Fischlarven während des in dieser Arbeit betrachteten Alterspektrums (bis etwa zum Zeitpunkt der Metamorphose) ist eher mit dem Entwicklungsstand der Larven korreliert als mit dem Alter (Sieg 1995). Die Darstellung der Enzymaktivitäten bezogen auf die Larvengrösse (= Länge) kompensiert daher teilweise das ungleichmässige Wachstum der Larven, was bessere Vergleiche zwischen den unterschiedlich ernährten Gruppen ermöglicht. Die Darstellung der Trypsinaktivität in Bezug zur Larvenlänge ist vor allem von Bedeutung für die Anwendung der Laborkalibrierungen auf Feldproben.

3.2.1.1 Hering (*Clupea harengus* L.)

Zu Kalibrierungszwecken wurden zweimal in unterschiedlichen Jahren Heringslarven aufgezogen. Die folgenden Ergebnisse zeigen den Zusammenhang von Larvenalter, Larvenlänge und verschiedenen Futterbedingungen mit der Trypsinaktivität von Heringslarven.

Heringslarvenaufzucht 1986

Die Entwicklung der Trypsinaktivität mit zunehmendem Larvenalter für die Futter- und Hungergruppen zeigt die Abb. 52. Bereits die frischgeschlüpften Larven verfügen über ein Potential an Trypsinaktivität, das zunächst unabhängig von den Futterkonditionen bis zum 9. Tag noch leicht ansteigt. Dies ist besonders gut an der ersten Hungergruppe zu verfolgen, auch diese unter Futterentzug gehaltenen Larven zeigen denselben ansteigenden Trend bei der Enzymaktivität. Nach kurzem Einbruch folgt dann eine Zunahme der Trypsinaktivität bis zum Versuchsende nach 45 Tagen. Die Streuung ist allerdings beträchtlich und die höchsten Trypsinaktivitäten wurden nicht bei den ältesten Larven sondern in den Proben um den 15. und 25. Tag festgestellt. Die Hungergruppen zeigen in der Regel geringere Trypsinaktivitäten als gleichaltrige gefütterte Larven, abgesehen von der oben bereits erwähnten Ausnahme. Es ist zu beobachten, dass die Larven unterschiedlich schnell auf Futterentzug reagieren. Die Variabilität ist bei den Hungergruppen deutlich geringer als bei den gefütterten Larven.

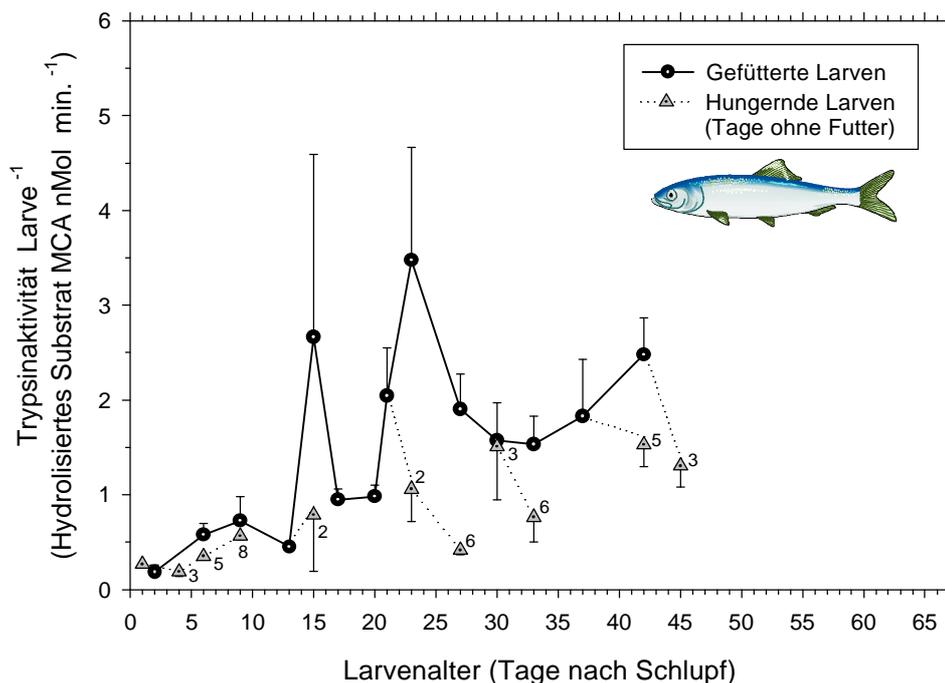


Abb. 52: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Heringslarven von der Aufzucht 1986 bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 7-15 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls. Die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode in Tagen.

Den Verlauf der Trypsinaktivitäten bei Futter- und Hungergruppen in Beziehung zur Larvenlänge zwischen 5.5 und etwa 20 mm zeigt die Abb. 53. Die Trypsinaktivitäten steigen auch bei den Hungergruppen bis zum Versuchsende mit zunehmender Larvenlänge an. Es finden sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Futter- und Hungergruppen.

In der Abb. 54 wird das Längenwachstum der Heringslarven in Beziehung zum Alter bei gefütterten und hungernden Larven betrachtet. Die Längenzunahme ist bei beiden Gruppen linear mit dem Alter korreliert. Der Vergleich beider Regressionsgeraden zeigt geringe Unterschiede bei der Steigung, der Unterschied zwischen den Achsenabschnitten ist signifikant ($p < 0.05$, Regressionsgeradenvergleich nach Zar 1984). Die Darstellung der Residuen veranschaulicht die Variabilität der Längenbereiche um die angepassten Regressionsgeraden für gefütterte Larven; die zunehmende Länge der Residuen zeigt die ansteigende Variabilität der Larvenlänge mit dem Alter in den Proben. Weiterhin lässt sich erkennen, ob Abweichungen vom linearen Längenzuwachs während der beobachteten Zeitspanne vorkamen. Die gefütterten Heringslarven zeigten bei dieser Aufzucht eine Wachstumsdepression zwischen dem 12. und 22. Tag. Danach ist eine gleichmäßige Längenzunahme zu erkennen.

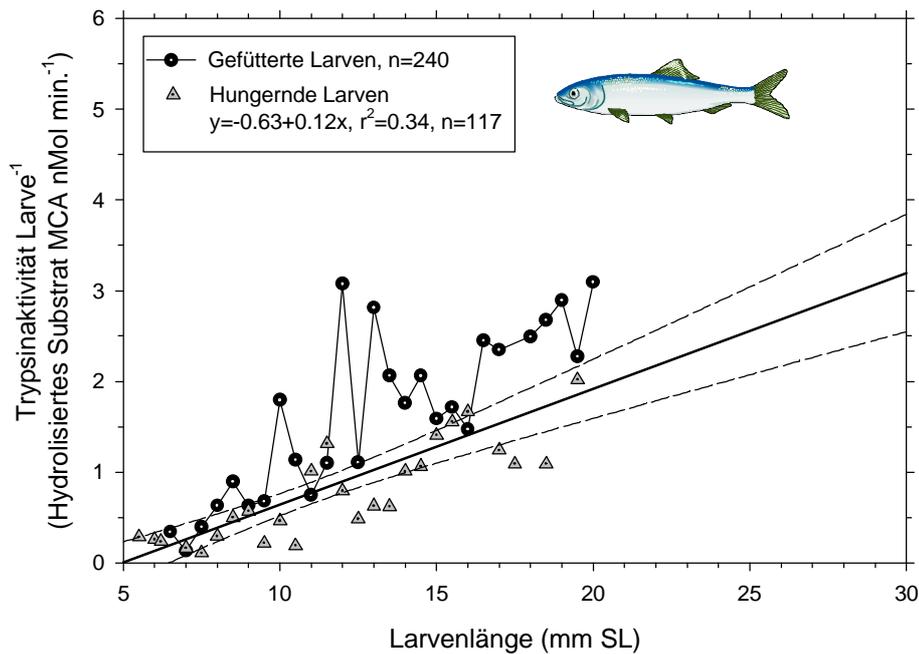


Abb. 53: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Heringslarven (Hungerdauer 2-6 Tage) von der Aufzucht 1986 in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden jeweils in 0.5mm-Schritten errechnet (entsprechend der Genauigkeit bei der Längenmessung). An die Daten der hungernden Larven wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse eine Gerade mit dem Vertrauensbereich der Regression (95%) angepasst.

Heringslarvenaufzucht 1989

Die Heringslarvenaufzucht 1989 dauerte 65 Tage und war damit deutlich länger als die Aufzucht 1986. Die Abb. 55 zeigt den Verlauf der Trypsinaktivitäten während dieses Experiments für gefütterte Larven bei verschiedenen Futterdichten sowie für die Hungergruppen. Der Verlauf der Trypsinaktivität bei den gefütterten Larven ist dem Verlauf bei der Aufzucht 1986 sehr ähnlich. Nach anfänglich steilen Anstieg gibt es einen Einbruch nach etwa 20 Tagen. Die Aktivitäten bewegen sich dann auf ungefähr derselben Höhe bis zum Alter von etwa 45 Tagen, dann erfolgt erneut ein steiler Anstieg. Zum Versuchsende erreicht die Aktivität ihre Maximalwerte. Insgesamt ist wiederum eine grosse Streuung der Trypsinaktivitäten um den Mittelwert bei den gefütterten Larven zu beobachten. Die Aktivitäten der Heringslarven, welche bei geringen Futterdichten gehalten wurden (vergl. 2.2.2), folgen annähernd dem beschriebenen Trend, jedoch auf einem etwas geringeren Niveau. Bei den Hungergruppen ist ab 2-4 Tagen Hunger fast immer ein deutlicher Unterschied zur Futtergruppe zu erkennen.

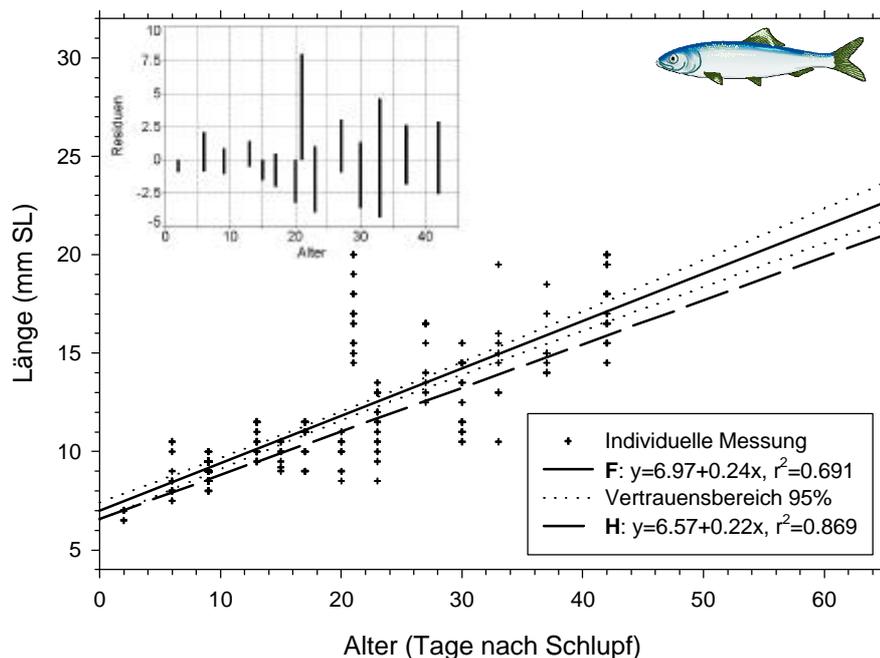


Abb. 54: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei den Heringslarven von der Aufzucht 1986. An die individuellen Wertepaare von Länge und Alter wurden bei gefütterten und hungernden Larven Regressionsgeraden angepasst (mit Vertrauensbereich für gefütterte Larven), die signifikant unterschiedlich sind ($p < 0.05$). Die gezeigten Messpunkte repräsentieren die Werte für gefütterte Larven, eine Markierung kann mehrere Larven mit denselben Wertepaaren vereinen (die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 53 vermerkt). Für hungernde Gruppen wird zur Erhaltung der Übersichtlichkeit nur die Regressionsgerade gezeigt. Die Residuen in der kleinen Abbildung verdeutlichen die Abweichungen der individuellen Werte von der Regressionsgeraden nach oben oder unten um eine Nulllinie.

Den Verlauf der Trypsinaktivitäten bei Futter- und Hungergruppen in Beziehung zur Larvenlänge zwischen 6 und 27 mm zeigt die Abb. 56. Die Trypsinaktivitäten steigen bei beiden Gruppen bis zum Versuchsende an. Zwischen den gefütterten und hungernden Larven sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Die Gruppen mit den geringen Futterdichten liegen tendenziell zwischen den beiden Extremkonditionen. Die Streuung ist bei den gefütterten Larven ähnlich hoch wie bei der Aufzucht 1986. Bei den hungernden Larven ist die Streuung wiederum deutlich geringer. An die Daten der hungernden Larven wurde eine lineare Regression angepasst.

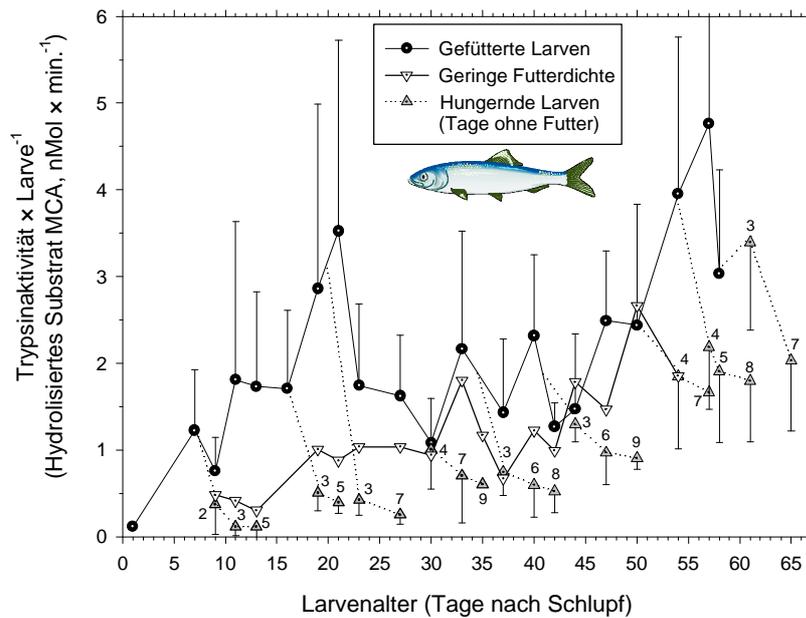


Abb. 55: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei Heringslarven mit unterschiedlichen Fütterungskonditionen und hungernden Heringslarven von der Aufzucht 1989 bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 3-16 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen vom jeweiligen Mittelwert. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode in Tagen.

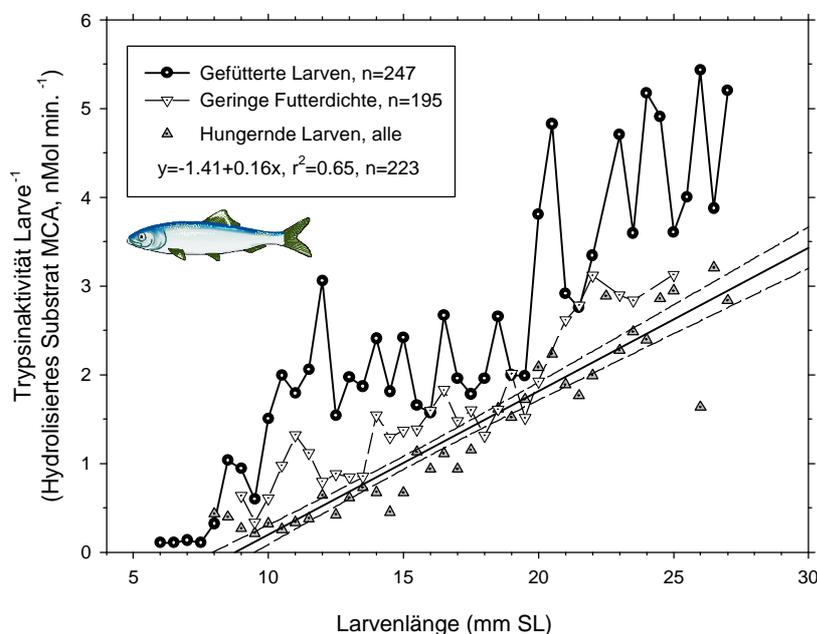


Abb. 56: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei Heringslarven von der Aufzucht 1989 die mit hoher und geringer Futterdichte aufgezogen wurden sowie von hungernden Heringslarven (Hungerdauer 2-9 Tage) in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden jeweils in 0.5 mm-Schritten errechnet (entsprechend der Genauigkeit bei der Längenmessung). An die Daten der Hungergruppen wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse eine Gerade mit dem Vertrauensbereich (95%) angepasst.

In der Abb. 57 wird das Längenwachstum der Heringslarven von der Aufzucht 1989 in Beziehung zum Alter bei gefütterten und hungernden Larven betrachtet. Die Längenzunahme ist bei beiden Gruppen linear mit dem Alter korreliert. Der Vergleich der Regressionsgeraden zeigt einen parallelen Verlauf und einen signifikanten Unterschied beim Achsenabschnitt ($p < 0.05$, Regressionsgeradenvergleich). Die Darstellung der Residuen veranschaulicht die beträchtlich ansteigende Variabilität der Längenbereiche mit dem Alter. Abweichungen vom geradlinigen Längenzuwachs für die gefütterten Heringslarven von der Aufzucht sind während der beobachteten Zeitspanne zwischen dem 20. und 30. Tag nach unten und zwischen dem 45. und 55. Tag nach oben erkennbar. In den übrigen Bereichen ist eine gleichmässige Längenzunahme zu erkennen. Der Vergleich mit der Aufzucht von 1986 zeigt ein fast identisches Längenwachstum für die gefütterten Larven. Dies spricht für vergleichbare Fütterungskonditionen.

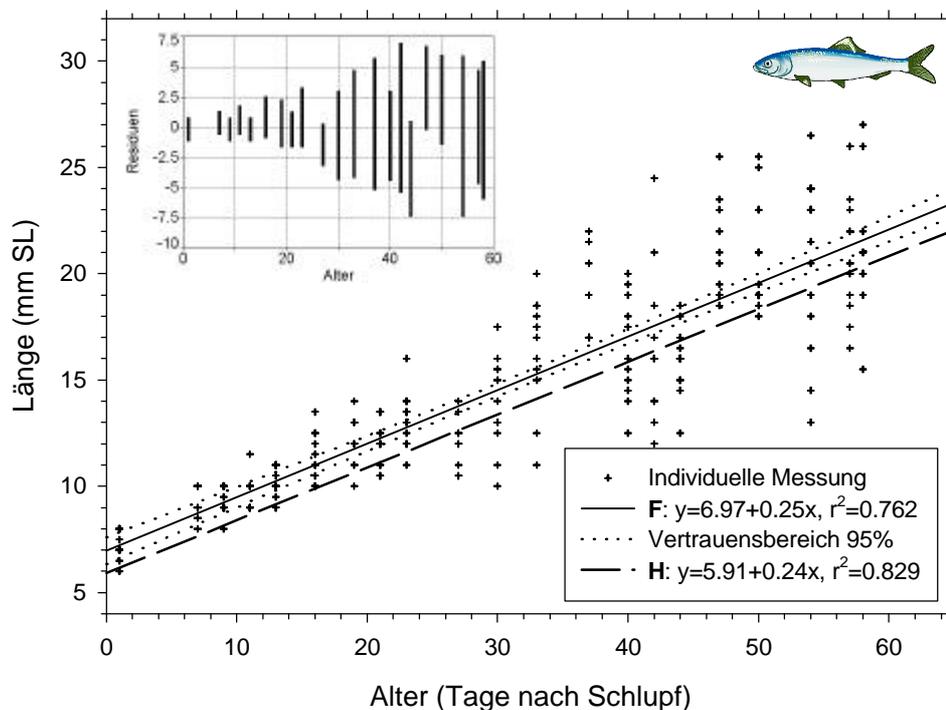


Abb. 57: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei den Heringslarven von der Aufzucht 1989. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 56 vermerkt. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54.

Temperatureinfluss bei der Aufzucht

Eine genaue Analyse des Temperatureinflusses auf den Indikator Trypsinaktivität durch parallele Proben aus verschiedenen temperierten Versuchsbecken konnten im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt werden. Es standen aber die Daten aus zwei Heringslarvenaufzuchten aus verschiedenen Jahren zum Vergleich zur Verfügung, bei denen die Temperaturverhältnisse um bis zu 5°C unterschiedlich waren. (Abb. 58a & b). Der Trend im Verlauf

der Trypsinaktivität während der ontogenetischen Entwicklung ist jedoch bei beiden Aufzuchten vergleichbar.

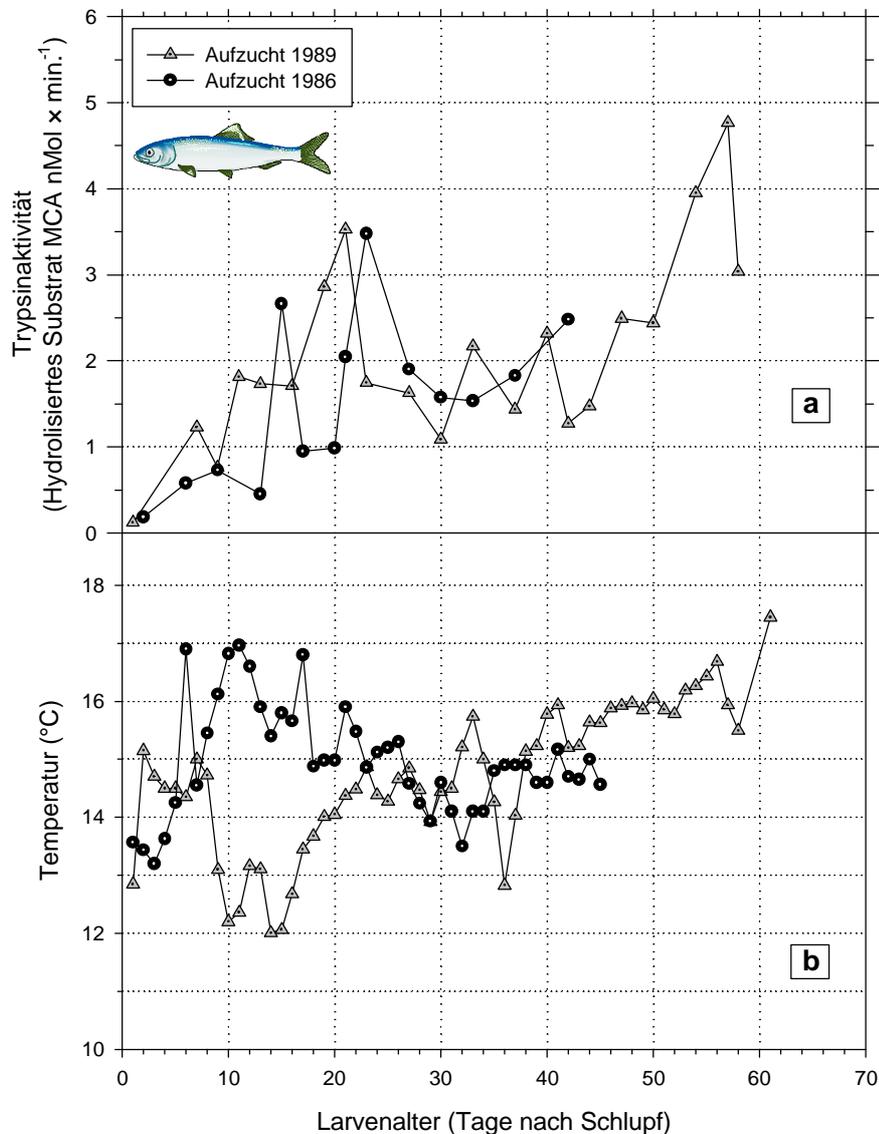


Abb. 58a & b: Erste (1986) und zweite (1989) Heringslarvenaufzucht. Vergleich der Trypsinaktivitäten (a) und des Temperaturverlaufs (b) während der beiden Aufzuchtversuche in Beziehung zum Larvenalter.

3.2.1.2 Steinbutt (*Scophthalmus maximus* L.)

Steinbuttlarven wurden 1986 zweimal in einem sich überschneidenden Zeitraum unter identischen Bedingungen aufgezogen.

Erste Steinbuttlarvenaufzucht 1986

Die Entwicklung der Trypsinaktivität wurde bei der Aufzucht 1986 bei gefütterten und hungrigen Steinbuttlarven vom Schlupf bis zum Alter von 30 Tagen untersucht (Abb. 59).

Während der ersten 10 Tage nach dem Schlupf ist eine geringe Aktivität zu beobachten, die dann steil ansteigt. Eine Unterscheidung zwischen hungernden und gefütterten Larven ist, vergleichbar mit der Situation bei Heringslarven, erst ab dem 10. Tag möglich. Um den 15. Tag erfolgt ein Einbruch in der Aktivität. Um den 20. Tag werden die höchsten Aktivitäten bei der Futtergruppe im Versuchszeitraum beobachtet. Danach erfolgt erneut ein Rückgang auf ein Niveau vergleichbar mit den Werten zwischen dem 10. und 15. Lebenstag. Die Futtergruppe mit reduzierter Futterdichte zeigt deutlich geringere Aktivitäten, folgt im Trend aber den Aktivitäten der Futtergruppe mit hoher Futterdichte. Damit ist eine unzureichende bzw. schwankende Futterdichte als Ursache für den Verlauf der Trypsinaktivitäten bei den Futtergruppen unwahrscheinlich. Ein sehr ähnlicher Verlauf wurde bereits bei früheren Experimenten mit Steinbuttlarven beobachtet (Ueberschär 1985). Die Hungergruppen reagieren bereits nach 3-4 Tagen Futterentzug deutlich mit einer Reduzierung der Trypsinaktivitäten. Ein weiteres Hungern von bis zu 7 Tagen hat kaum noch einen weiteren Effekt auf die Trypsinaktivität. Die Streuung zwischen den Individuen (dargestellt als Standardabweichung) ist bei der Futtergruppe mit hoher Futterdichte am höchsten, nimmt bei der Gruppe mit geringer Futterdichte ab und ist am geringsten bei den Hungergruppen. Im Vergleich zu den Heringslarven erreichen die Trypsinaktivitäten bei den Steinbuttlarven einen etwa 50fach höheren Maximalwert.

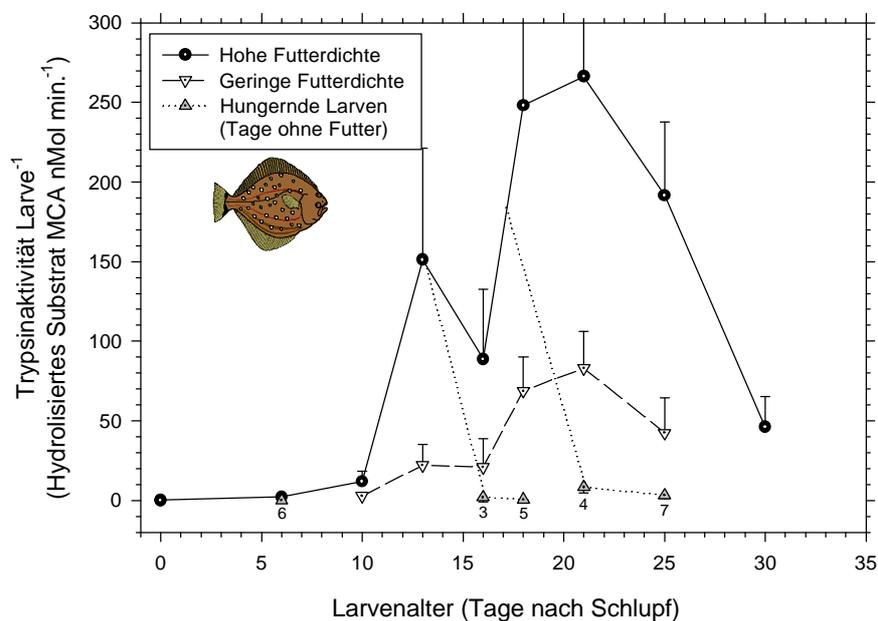


Abb. 59: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei Steinbuttlarven von der ersten Aufzucht 1986 bei hoher und geringer Futterdichte sowie bei hungernden Steinbuttlarven bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 4-15 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode in Tagen.

Die Korrelation der Aktivitäten mit der Larvenlänge zeigt einen deutlich unterschiedlichen Trend zwischen den drei verschiedenen Ernährungsbedingungen (Abb. 60). An die Werte der Hungergruppen wurde eine lineare Regression signifikant angepasst ($p < 0.05$).

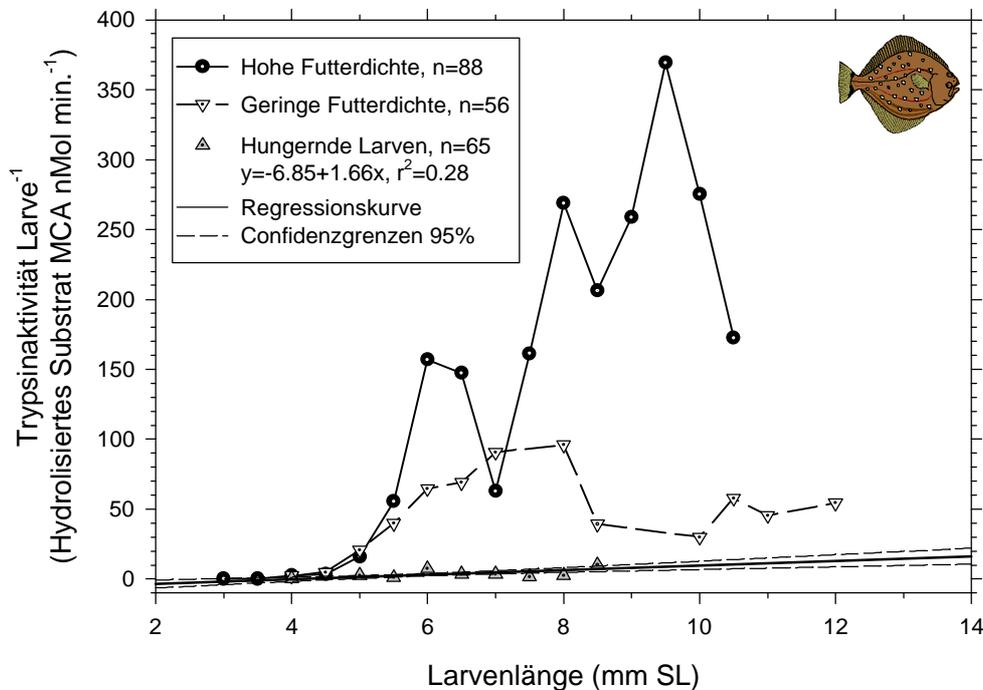


Abb. 60: Trypsinaktivitäten bei Steinbuttlarven von der ersten Aufzucht 1986, die bei hoher und geringer Futterdichte aufgezogen wurden, sowie von hungernden Steinbuttlarven (Hungerdauer 3-7 Tage) in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden in 0.5mm-Schritten errechnet. An die Daten der ungefütterten Larven wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse eine Gerade mit dem Vertrauensbereich (95%) angepasst.

In der Abb. 61 wird das Längenwachstum der Steinbuttlarven von der ersten Aufzucht 1986 in Beziehung zum Alter bei gefütterten und hungernden Larven gesetzt. Die Längenzunahme ist bei beiden Gruppen linear mit dem Alter korreliert. Der Vergleich der Regressionsgeraden zeigt signifikante Unterschiede bei der Steigung ($p < 0.05$, Regressionsgeradenvergleich). Die eher gleichmässige Länge der Residuen zeigt eine geringe Variabilität der Larvenlänge mit dem Alter. Da die Larven vom Steinbutt ein eher isometrisches Wachstum zeigen, ist die Länge als Indikator für die Variabilität des Wachstums weniger gut geeignet wie z.B. bei Heringslarven. Die Abweichungen vom geradlinigen Längenzuwachs nach unten zwischen dem 10. und 16. Tag zeigt eine Stagnation im Wachstum an, Abweichungen nach oben ab dem 18. Tag eine erhöhte Wachstumsrate.

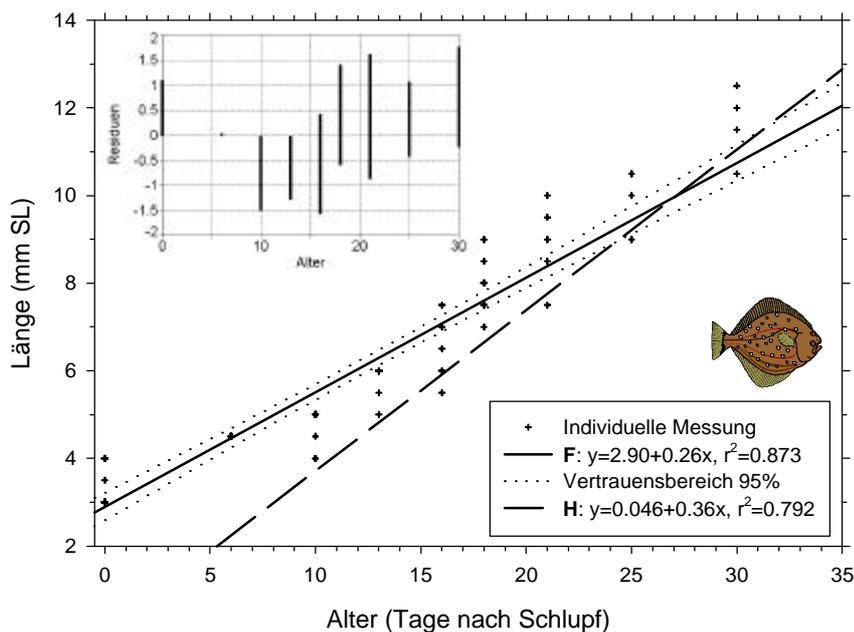


Abb. 61: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei den Steinbuttlarven von der ersten Aufzucht 1986. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 60 vermerkt.

Zweite Steinbuttlarvenaufzucht 1986

Die Entwicklung der Trypsinaktivitäten bei der zweiten Steinbuttlarvenaufzucht wurde vom Schlupf bis zum Alter von 32 Tagen verfolgt (Abb. 62). Der Verlauf ist nach der Dottersackphase bis zum 15. Tag vergleichbar mit dem bei der ersten Aufzucht. Nach anfänglich geringen Werten folgt ein steiler Anstieg mit einem Maximalwert um den 15. Tag. Danach folgt aber ein inverser Verlauf verglichen mit der ersten Aufzucht (vergl. auch Abb. 65a). Ein erneuter Anstieg ist am 23. Tag zu beobachten, von hier an sind die Verhältnisse wieder zeitlich synchron mit der ersten Aufzucht. Zum Ende der Experimente fällt die Aktivität auf das Niveau vom 15. Lebenstag zurück, was sich mit den Beobachtungen aus der ersten Aufzucht deckt. Auch bei diesem Experiment folgt der Verlauf der Trypsinaktivitäten bei der Gruppe mit geringer Futterdichte dem Muster bei der Gruppe mit hoher Futterdichte, jedoch wieder auf geringerem Niveau und die Amplituden sind weniger ausgeprägt. Eine Unterscheidung zwischen gefütterten und hungernden Larven ist erst nach dem 10. Tag möglich. Die Hungergruppen unterscheiden sich in der Regel deutlich von denen der beiden Futtergruppen. Nach 3 Tagen sind bereits geringste Werte erreicht, die durch längere Hungerperioden kaum noch unterschritten werden. Die absoluten Maximalwerte der Trypsinaktivität sind bei dieser Aufzucht etwa um den Faktor 7 geringer im Vergleich mit der ersten Aufzucht.

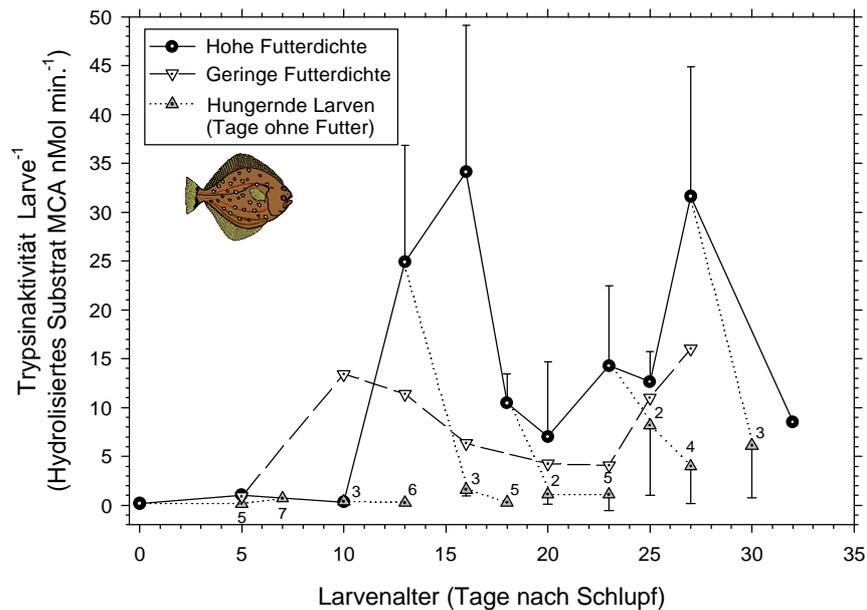


Abb. 62: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei Steinbuttlarven von der zweiten Aufzucht 1986, die mit hoher und geringer Futterdichte aufgezogen wurden, und bei hungernden Steinbuttlarven bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 2-13 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode.

Die Zuordnung der Trypsinaktivitäten zur Larvenlänge zeigt eine grössere Streuung als bei der ersten Aufzucht, und die Unterschiede zwischen hoher und geringer Futterdichte sind nicht so deutlich (Abb. 63). An die Messwerte der Hungergruppen wurde eine Regressionsgerade signifikant angepasst ($p < 0.05$).

In der Abb. 64 wird das Längenwachstum der Steinbuttlarven von der zweiten Aufzucht 1986 in Beziehung zum Alter bei gefütterten und hungernden Larven betrachtet. Die Längenzunahme ist bei beiden Gruppen linear mit dem Alter korreliert. Beide Regressionsgeraden zeigen nur geringe, nicht signifikante Unterschiede bei der Steigung und dem Achsenabschnitt ($p < 0.05$, Regressionsgeradenvergleich). Wie oben schon erwähnt, ist die Länge bei Steinbuttlarven nur ein schwaches Mass für die Darstellung der Wachstumsvariabilität, Unterschiede bei den Residuen sind vor allem im zeitlich mittleren Teil der Aufzucht zu erkennen. Abweichungen von der linearen Längenzunahme sind nach dem 20. Tag erkennbar. Der Vergleich der Wachstumsparameter von dieser Aufzucht mit der ersten Steinbuttlarvenaufzucht zeigt deutliche Unterschiede in der Steigung der Regressionsgeraden für gefütterte Larven. Bei den Larven von der Futtergruppe aus der ersten Aufzucht wurde eine höhere Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt. Diese Beobachtung ist kohärent zur im Mittel deutlich höheren Trypsinaktivität bei den Larven von der ersten Aufzucht.

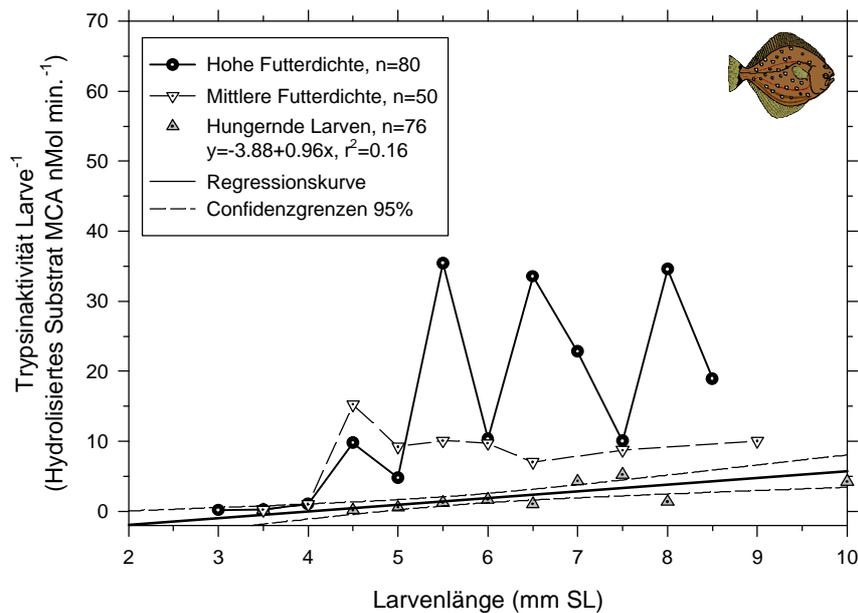


Abb. 63: Trypsinaktivitäten bei Steinbuttlarven von der zweiten Aufzucht 1986, die bei hoher und geringer Futterdichte aufgezogen wurden, sowie von hungernden Steinbuttlarven (Hungerdauer 2-7 Tage) in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden in 0.5mm-Schritten errechnet. An die Daten der ungefütterten Gruppen wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse eine Gerade angepasst und mit dem Vertrauensbereich der Regression (95%) gezeigt.

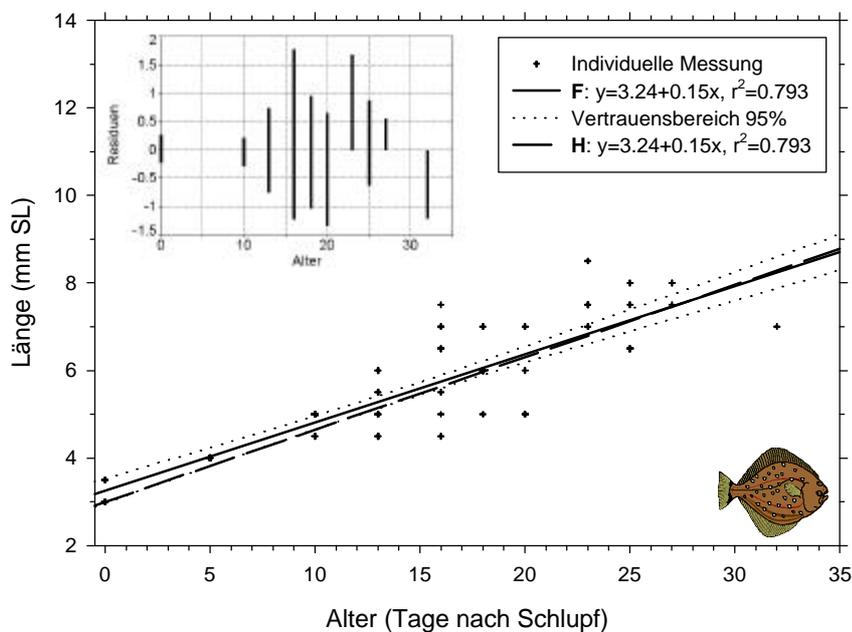


Abb. 64: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei den Steinbuttlarven von der zweiten Aufzucht 1986. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 63 vermerkt.

Temperatureinfluss bei der Aufzucht

Wie bei den Heringslarven standen für Steinbuttlarven die Datensätze aus zwei hintereinander durchgeführten Larvenaufzuchten zum Vergleich zur Verfügung, bei denen die Temperaturregime Unterschiede von bis zu 3°C aufwiesen (Abb. 65a & b). Der generelle Trend im Verlauf der Trypsinaktivität während der ontogenetischen Entwicklung ist für die jüngeren und ältesten Stadien trotz unterschiedlicher absoluter Werte bei beiden Aufzuchten ähnlich. Im zeitlich mittleren Teil der Aufzucht wurden jedoch genau entgegengesetzte Verhältnisse beobachtet.

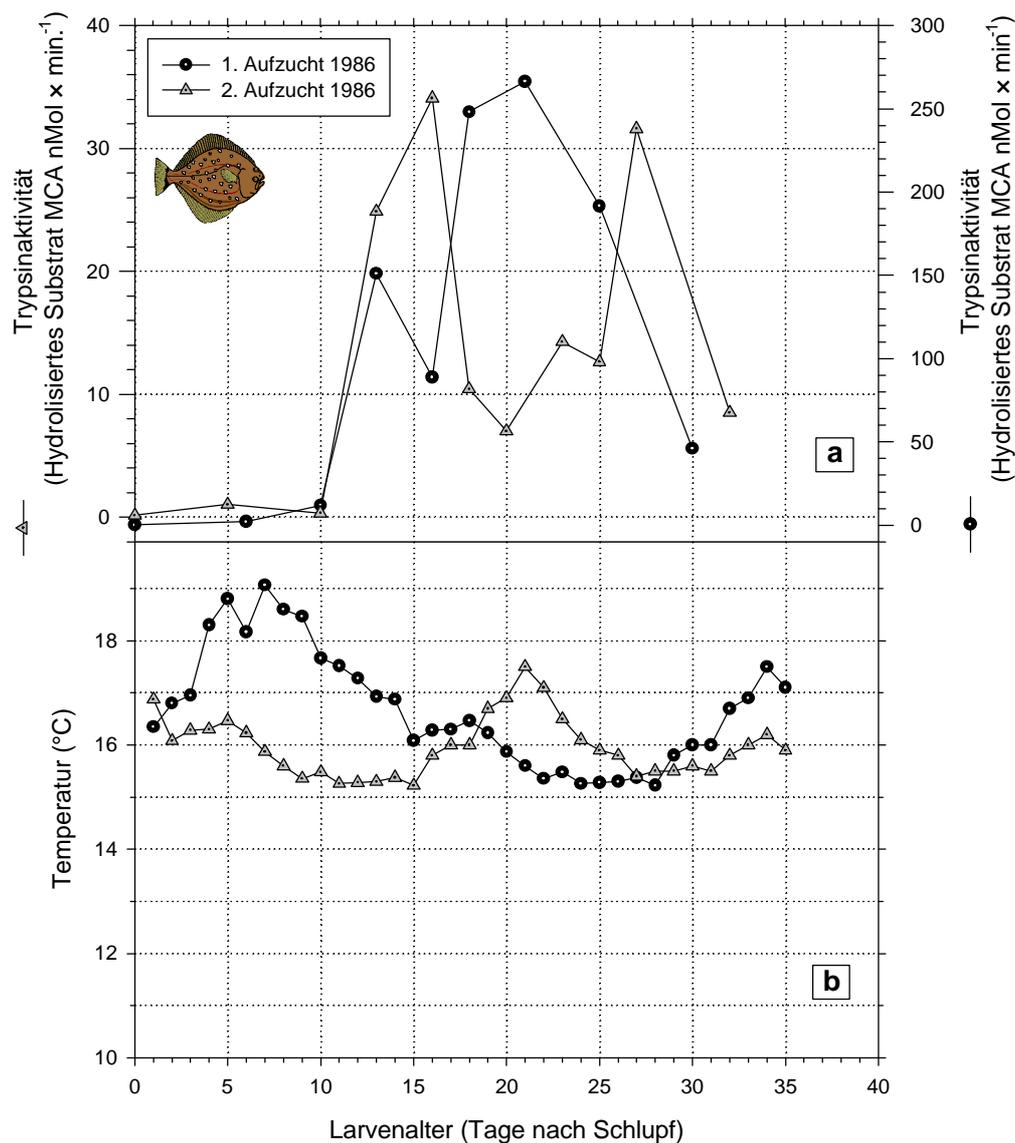


Abb. 65a & b: Erste und zweite Steinbuttlarvenaufzucht 1986. Vergleich der Trypsinaktivitäten (a) und des Temperaturverlaufs (b) während der beiden Aufzuchtversuche in Beziehung zum Larvalalter. Wegen der deutlich geringeren Trypsinaktivitäten bei der zweiten Aufzucht wurden unterschiedlich skalierte y-Achsen verwendet (Abb. 65a).

3.2.1.3 Dorsch (*Gadus morhua* L.)

Die Entwicklung der Trypsinaktivität bei Dorschlarven wurde bei einer Aufzucht vom Schlupf bis zum Alter von 36 Tagen bei einer Gruppe mit hoher Futterdichte und parallel dazu bei hungernden Larven verfolgt. Die stetige Zunahme der Trypsinaktivitäten mit dem Alter erfolgt ohne grössere Einbrüche (Abb. 66), wie sie etwa bei Steinbuttlarven zu beobachten waren. Auch bei den Dorschlarven verlaufen die ersten 10 Tage nach dem Schlupf ohne grössere Änderungen der Trypsinaktivität, gefolgt von einem deutlichen Anstieg, der bis zum Ende der Experimente stetig anhält. Das erste Hungerexperiment wurde nach dem 9. Tag gestartet. Bereits nach 2 Tagen Futterentzug sind deutliche Unterschiede zur gleichaltrigen Futtergruppe erkennbar, die bei den folgenden Hungerexperimenten noch deutlicher werden. Nach 5-7 Tagen sind die niedrigsten Aktivitätswerte erreicht, längeres Hungern bringt kaum noch Veränderungen. Die maximalen Aktivitäten bei den gefütterten Larven liegen etwa in der Grössenordnung wie sie bei gefütterten Heringslarven gefunden wurden.

In Bezug auf das Larvenalter zeigt die Zunahme der Trypsinaktivität bei der Futtergruppe einen eher exponentiell ansteigenden Verlauf. Bei den hungernden Dorschlarven dagegen kann mit einer guten Anpassung an die individuellen Werte eine Gerade angelegt werden (Abb. 67). Bei den jüngsten Larvenstadien (4-5 mm) zeigen sich nur geringe Unterschiede zwischen gefütterten und hungernden Gruppen.

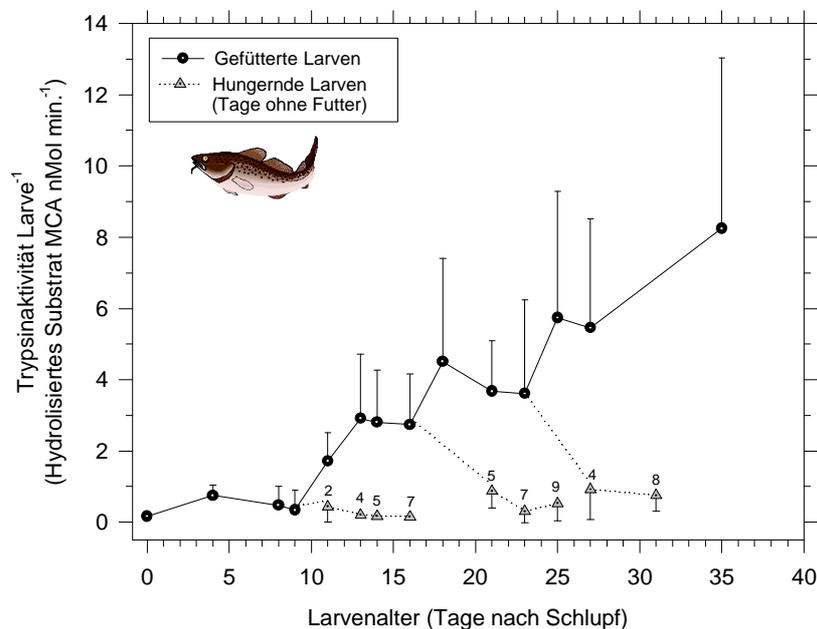


Abb. 66: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Dorschlarven bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 9-20 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode.

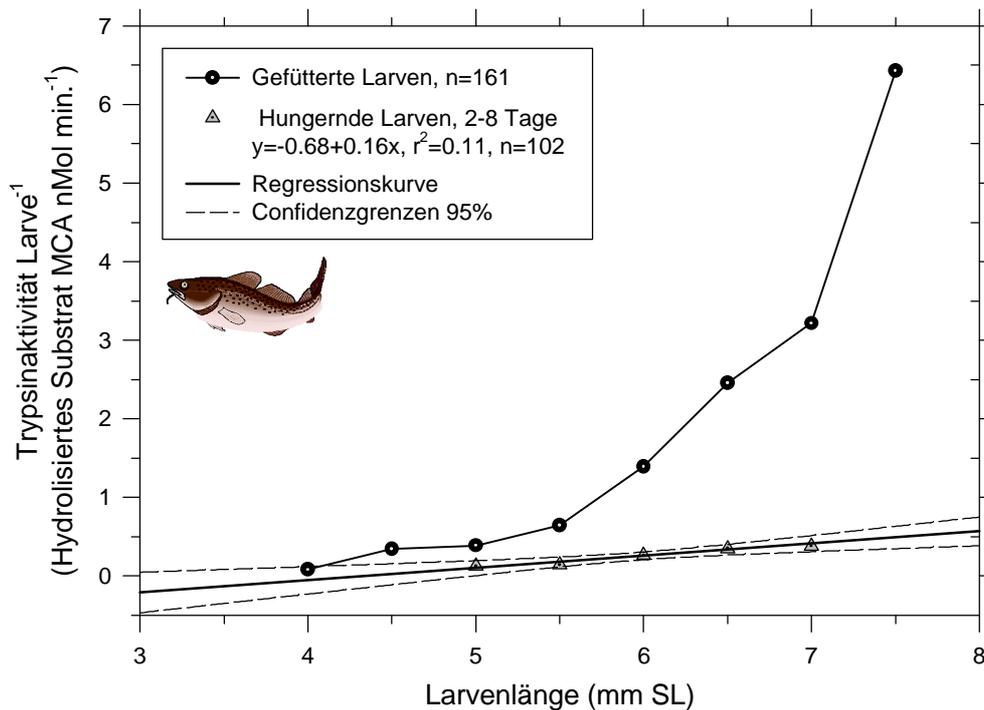


Abb. 67: Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Dorschlarven in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden in 0.5mm-Schritten errechnet. An die Werte der Hungergruppen wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse eine Gerade angepasst und mit dem Vertrauensbereich der Regression (95%) gezeigt.

Abb. 68 zeigt das Längenwachstum in Beziehung zum Alter für gefütterte und hungernde Dorschlarven. Die Längenzunahme ist bei beiden Gruppen linear mit dem Alter korreliert. Im Vergleich zeigen die Regressionsgeraden Parallelität bei der Steigung, der Unterschied zwischen den Achsenabschnitten ist signifikant ($p < 0.05$, Regressionsgeradenvergleich). Die Residuen zeigen kaum Unterschiede bei der Variabilität der Länge mit zunehmendem Alter bei den Dorschlarven aus der Futtergruppe. Dies erklärt die eher durchgehend gradlinige Tendenz beim Vergleich der Trypsinaktivität mit dem Alter (vergl. Abb. 66). Da die Dorschlarven im beobachteten Zeitraum insgesamt nur einen sehr geringen Längenzuwachs zeigten (etwa 2.5 mm), ist die Trennschärfe für die Erkennung einer Variabilität beim Zuwachs über die Betrachtung der Länge, ähnlich wie bei Steinbuttlarven, gering. Andererseits kann dieses Ergebnis auch auf ein sehr gleichmäßiges Wachstum bei allen Dorschlarven in dieser Aufzucht hindeuten. Bei den Abweichungen vom geradlinigen Längenzuwachs sind 3 Phasen zu unterscheiden.

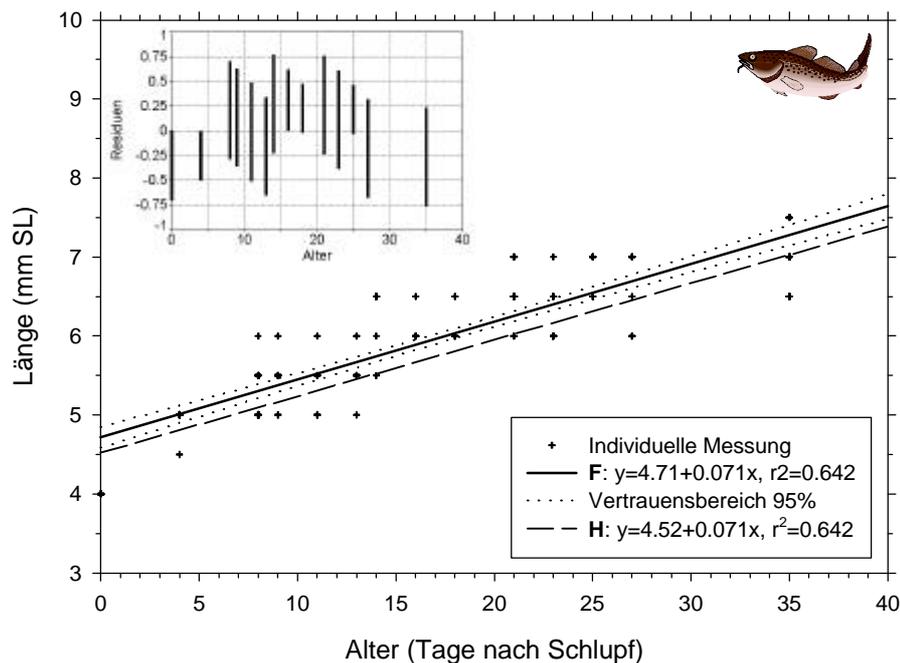


Abb. 68: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei Dorschlarven. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 67 vermerkt.

3.2.1.4 Wolfsbarsch (*Dicentrachus labrax* L.)

Wolfsbarschlarven wurden vom Schlupf bis zum 40. Tag aufgezogen. Für Kalibrierungszwecke wurden die Trypsinaktivitäten von gefütterten Larven mit jenen von hungernden Larven verglichen.

Wie schon bei den vorher beschriebenen Arten beobachtet, ist bis zum 10. Tag nach dem Schlupf nur eine geringe Veränderung bei der Trypsinaktivität zu beobachten (Abb. 69). In zwei Stufen folgt dann ein Anstieg der Enzymaktivitäten, vom 14. bis zum 17. Tag mit etwa gleichbleibenden Werten, danach ist ein steiler Anstieg zu beobachten, der am 33. Tag einen Maximalwert erreicht. Die letzte Probe zeigt dann wieder etwas geringere Aktivitäten. Die Variabilität ist, wie bei den Futtergruppen der anderen Arten, sehr ausgeprägt. Die Unterschiede bei der Trypsinaktivität zwischen gefütterten und hungernden Larven sind nach dem 17. Tag deutlich ausgeprägt. Nach Futterentzug sind bereits nach 2-4 Tagen annähernd die geringsten Werte erreicht. Längere Hungerperioden bis zu 7 Tagen bewirkten keine weitere deutliche Verringerung der Trypsinaktivität. Die Maximalwerte der Trypsinaktivität bei gefütterten Larven liegen etwa in der Größenordnung wie sie bei Steinbuttlarven von der zweiten Aufzucht festgestellt wurden.

Bei der Darstellung der Trypsinaktivität zur Larvenlänge entsprechen die Werte der Futtergruppen anfänglich einem exponentiellen Verlauf (Abb. 70). Mit zunehmender Länge sind jedoch deutliche Schwankungen zu erkennen.

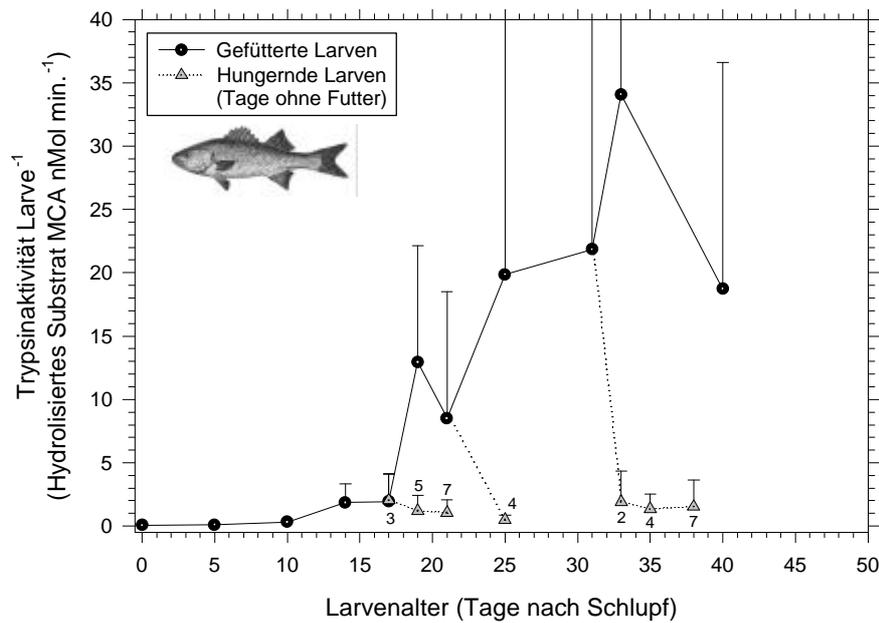


Abb. 69: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Wolfsbarschlarven bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 7-13 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode in Tagen.

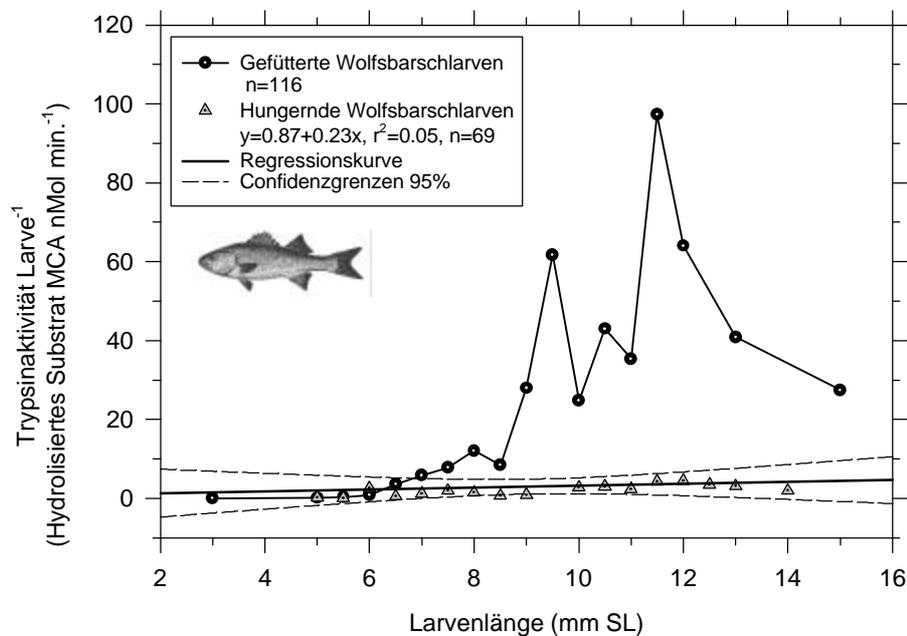


Abb. 70: Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Wolfsbarschlarven in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden in 0.5 mm-Schritten errechnet. An die Werte der hungernden Larven wurde eine lineare Regression angepasst und mit dem Vertrauensbereich der Regression (95%) gezeigt.

Die bei den Hungergruppen ermittelten Werte lassen sich mit genügender Genauigkeit an eine Gerade anpassen, die mit zunehmender Larvenlänge aber nur eine geringe Steigung aufweist. Dies lässt auf eine besonders ausgeprägte Reaktion bei Futterentzug auf die Regulation der Trypsinogenproduktion und -sezernierung schliessen.

In der Abb. 71 wird das Längenwachstum der Wolfsbarschlarven in Beziehung zum Alter bei gefütterten und hungernden Larven betrachtet. Die Längenzunahme ist bei beiden Gruppen linear mit dem Alter korreliert. Beide Regressionsgeraden zeigen nur geringe, nicht signifikante Unterschiede bei der Steigung und dem Achsenabschnitt ($p < 0.05$, Regressionsgeradenvergleich). Die zunehmende Länge der Residuen zeigt, mit Ausnahmen, die ansteigende Streuung der Larvenlänge mit dem Alter. Abweichungen von der linearen Längenzunahme nach unten sind vom 15. bis zum 21. Tag erkennbar.

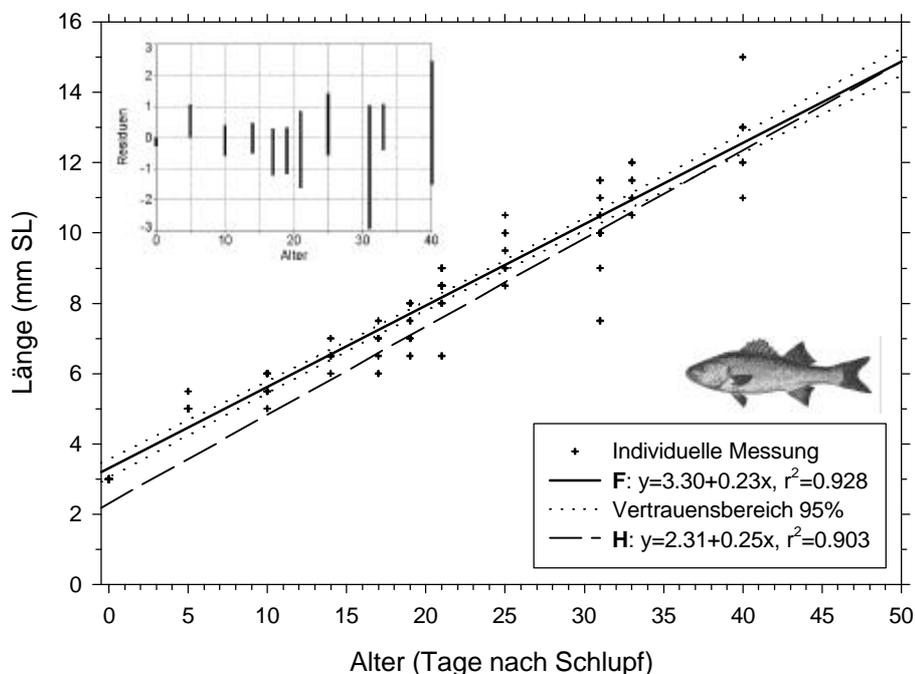


Abb. 71: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei Wolfsbarschlarven. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 70 vermerkt.

3.2.1.5 Goldbrassen (*Sparus aurata* L.)

Für Goldbrassenlarven liegen Messdaten für 2 bis 19 Tage alte, gefütterte und hungernde Larven vor. Der Verlauf der Trypsinaktivitäten in den ersten 10 Tagen ist bei geringem Anstieg zunächst gleichmässig und entspricht im wesentlichen dem Verhalten der Trypsinaktivität in diesem Zeitraum bei den oben bereits für die Kalibrierung vorgestellten Arten (Abb. 72). Ab dem 10. bis zum 14. Tag ist dann ein deutlicher Anstieg erkennbar, danach bewegt sich die Aktivität um das erreichte Niveau. Die individuelle Variabilität (ausgedrückt in der Standardabweichung) bei den gefütterten Larven dieser Art ist ähnlich ausgeprägt wie bei

den anderen bereits beschriebenen Arten aus der Laboraufzucht. Bei den Hungerexperimenten ist die erste deutliche Reaktion bei 10 Tage alten hungernden Larven erkennbar. Davor sind die Aktivitäten von gefütterten und hungernden Larven fast deckungsgleich. Bei den folgenden Hungerversuchen ist bereits nach einem Tag eine ausgeprägte Verringerung der Trypsinaktivität gegenüber gleichaltrigen gefütterten Larven erkennbar. Länger andauernde Hungerperioden haben keinen weiteren verringernden Effekt mehr auf die Trypsinaktivität. Die Maximalwerte für die Trypsinaktivität bei gefütterten Larven liegen in der Größenordnung von gleichaltrigen Heringslarven. Die Darstellung der Trypsinaktivität für die Goldbrassenlarven in Beziehung zur Larvenlänge zeigt eine exponentielle Tendenz bei gefütterten Larven und einen linearen Verlauf bei der Zusammenfassung der Hungergruppen (Abb. 73) Die geringe Steigung der an die Hungergruppen angepassten Regressionsgeraden zeigt eine ausgeprägte Reaktion der Trypsinregulation auf Futterentzug, vergleichbar mit den Verhältnissen bei den Wolfsbarschlarven.

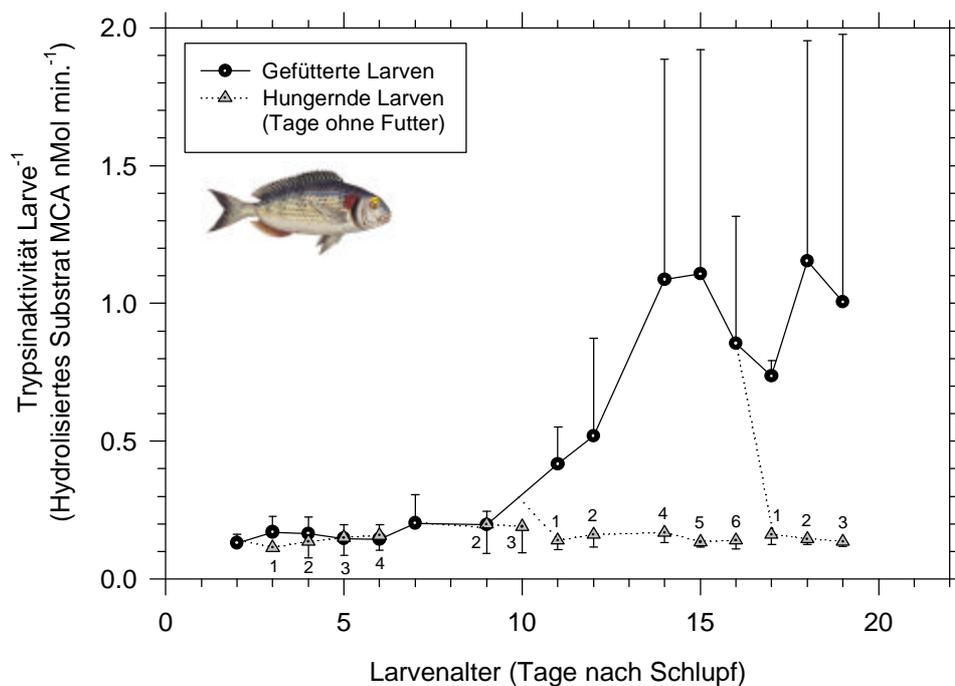


Abb. 72: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Goldbrassenlarven bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 8-20 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode in Tagen.

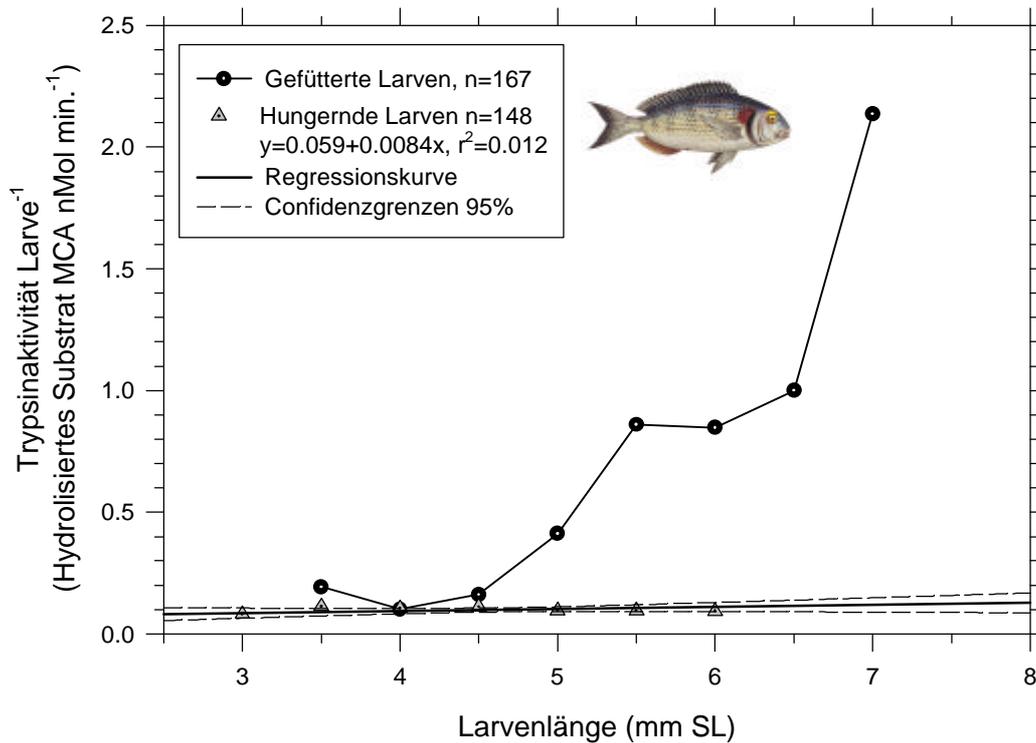


Abb. 73: Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Goldbrassenlarven in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden in 0.5mm-Schritten errechnet. Die Gerade bei den ungefütterten Gruppen wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse angepasst und wird mit dem Vertrauensbereich der Regression (95%) gezeigt.

In der Abb. 74 wird das Längenwachstum der Goldbrassenlarven in Beziehung zum Alter bei gefütterten und hungernden Larven betrachtet. Die Längenzunahme ist bei beiden Gruppen linear mit dem Alter korreliert. Im Vergleich zeigen die Regressionsgeraden eine signifikant unterschiedliche Steigung ($p < 0.05$, Regressionsgeradenvergleich). Die Variabilität der Residuen bei den gefütterten Goldbrassenlarven zeigt keine systematische Zunahme mit dem Alter sondern eher zufällig erscheinende Schwankungen, die in der Bevorzugung von bestimmten Längen bei der Probennahme begründet sein kann. Abweichungen vom geradlinigen Längenzuwachs nach unten sind zwischen dem 8. und 15. Tag zu erkennen, Abweichungen nach oben zwischen dem 14. und 17. Tag. Die Längenzunahme ist insgesamt gering in dem betrachteten Zeitraum (etwa 3 mm), daher ist die Trennschärfe bei der Länge zur Begutachtung der Wachstumsgeschwindigkeit eher schwach.

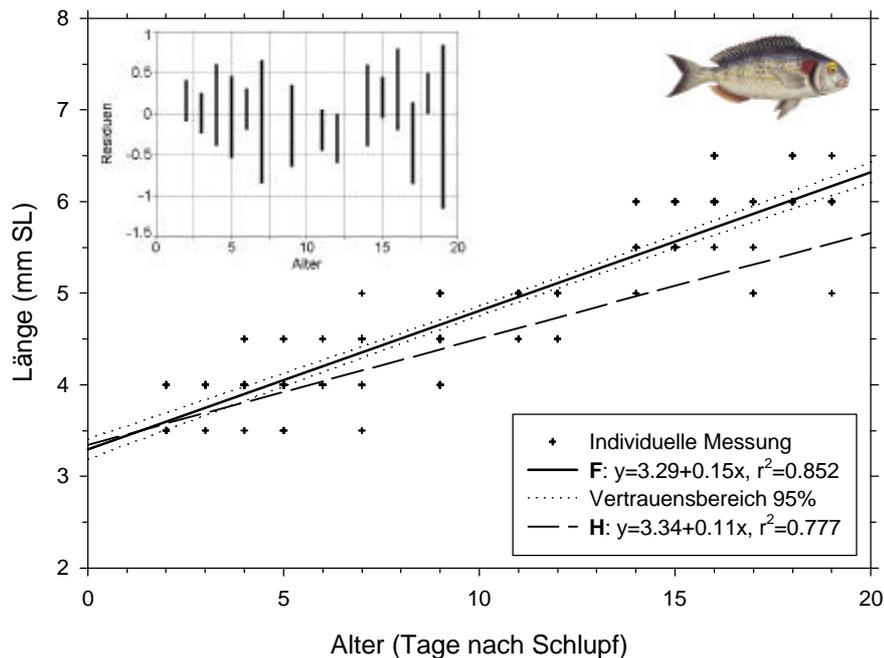


Abb. 74: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei Goldbrassenlarven. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 73 vermerkt

3.2.1.6 Brasilianische Sardine (*Sardinella brasiliensis* Steindachner 1879)

Bei Larven der brasilianischen Sardine wurden Trypsinaktivitäten bei 1 bis 13 Tage alten Larven bestimmt. Vom 1. bis zum 5. Tag nach dem Schlupf ist eine gleichmässige Trypsinaktivität auf relativ niedrigem Niveau zu beobachten (Abb. 75). Zwischen dem 5. und dem 8. Tag folgt dann ein rascher Anstieg mit anschliessender Verringerung der Aktivitäten. Ab dem 10. Tag ist dann wiederum ein stetiger Anstieg der Trypsinaktivität zu beobachten. Am Ende der Experimente werden die höchsten Trypsinwerte erreicht. Die Variabilität (ausgedrückt als Standardabweichung) ist bei den Futtergruppen ausgeprägt und deutlich höher verglichen mit den Hungergruppen. Bei den Hungergruppen ist bereits nach einem Tag ein deutlicher Unterschied zu den gefütterten Larven erkennbar, das Aktivitätsniveau ist nach 2 Tagen Futterentzug kaum geringer. Die Maximalwerte für die Trypsinaktivität sind vergleichbar mit denen von Heringslarven.

Bei der Darstellung der Trypsinaktivität in Bezug auf die Larvenlänge zeigen die Werte der Futtergruppen eine eher linear zunehmende Tendenz (Abb. 76). Bei den 8-10 mm langen Larven treten allerdings deutliche Abweichungen vom linearen Verlauf auf. Die bei den Hungergruppen ermittelten Werte lassen sich signifikant an eine Gerade anpassen, die mit zunehmender Larvenlänge nur eine sehr geringe Steigung aufweist. Dies lässt auch hier auf eine schnelle und ausgeprägte Reaktion auf die Regulation der Trypsinaktivität bei Futterentzug schliessen.

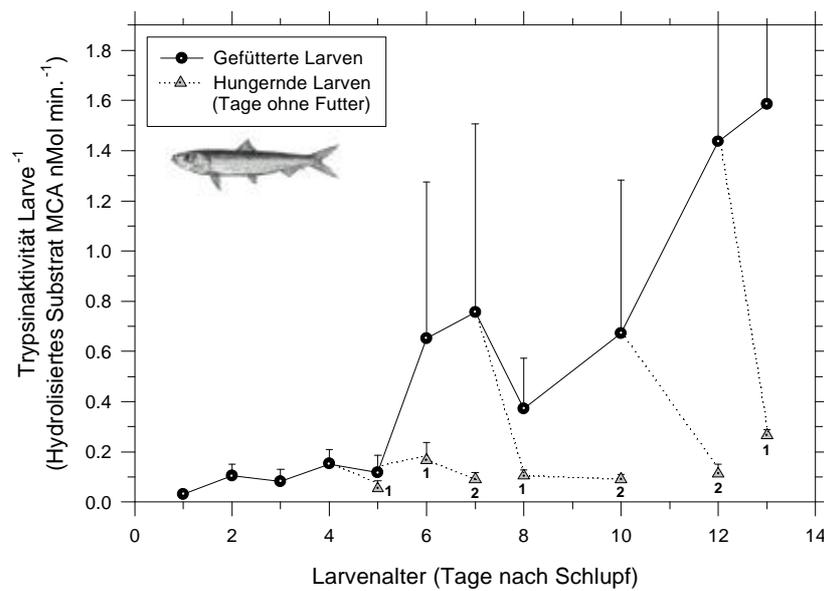


Abb. 75: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Sardinenlarven bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 3-22 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode.

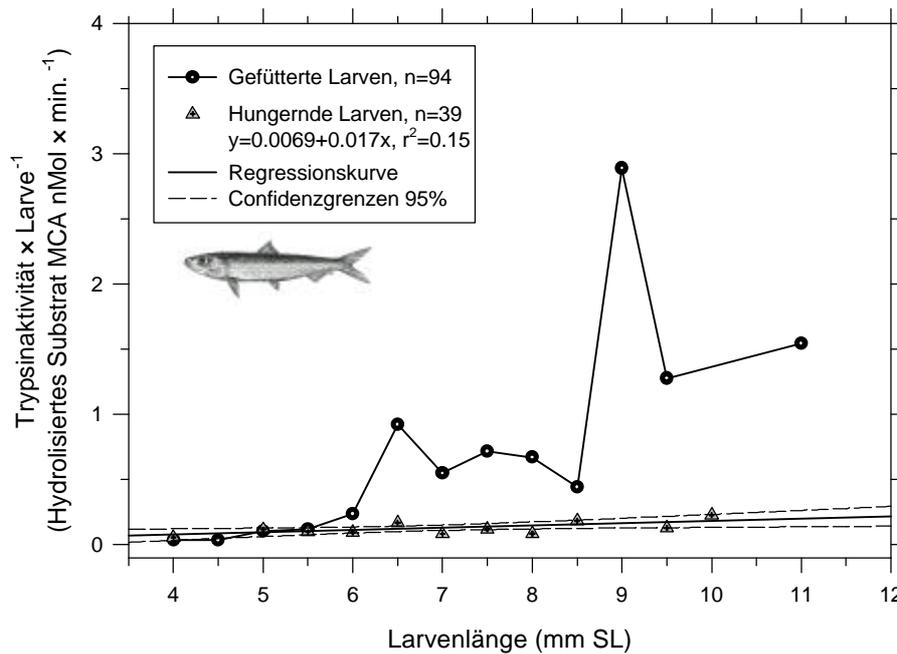


Abb. 76: Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Sardinenlarven in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden in 0.5 mm-Schritten errechnet. Die Gerade wurden mit Hilfe der Regressionsanalyse an die ungefütterten Larvengruppen angepasst und mit dem Vertrauensbereich der Regression (95%) gezeigt.

In der Abb. 77 wird das Längenwachstum der Sardinenlarven in Beziehung zum Alter bei gefütterten und hungernden Larven betrachtet. Die Längenzunahme ist bei beiden Gruppen linear mit dem Alter korreliert. Im Vergleich der Regressionsgeraden zeigt sich ein paralleler Verlauf, der Unterschiede beim Achsenabschnitt ist signifikant ($p < 0.05$, Regressionsgeradenvergleich). Abweichungen vom geradlinigen Längenzuwachs sind zwischen dem 3. und 5. Tag nach unten und zwischen dem 7. und 9. Tag nach oben erkennbar. Bei einer clupeiformen Art wie der Sardine kann grundsätzlich wegen des ausgeprägten Wachstums in die Länge, wie beim Hering, mit zunehmendem Alter mit einer deutlichen Zunahme der Variabilität bei der Länge gerechnet werden. Diese Streuung ist wegen der zeitlichen Kürze dieser Experimente aber nicht erkennbar.

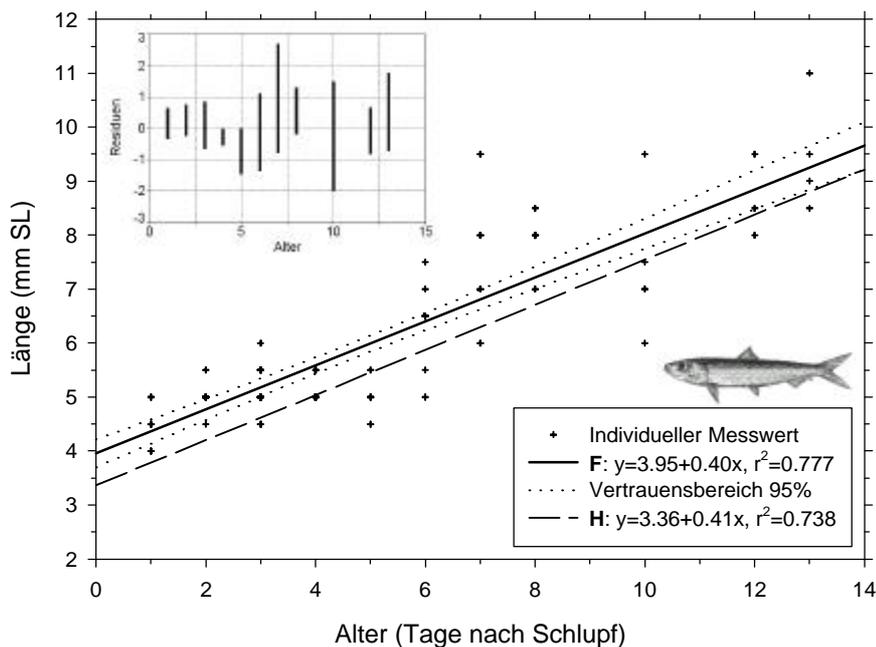


Abb. 77. Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei den Larven der brasilianischen Sardine. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 76 vermerkt.

3.2.2 Tagesrhythmik der Trypsinaktivität

In einigen Versuchen mit Herings-, Steinbutt- und Dorschlarven wurde die zeitlich kleinskalige Reaktion (Stunden bis Tage) der Trypsinaktivität auf Fütterungszeit, Futterration und zwischenzeitliche Hungerperioden untersucht.

3.2.2.1 Hering (*Clupea harengus* L.)

Heringslarven verschiedenen Alters aus der regulären Aufzucht von 1989 wurden im Stundenrhythmus der Futtergruppe mit hoher Futterdichte (*Brachionus plicatilis*, Futterdichte 5 ml^{-1} und *Artemia*-nauplien, 1 ml^{-1}) entnommen. Die ersten Proben wurden jeweils morgens vor der Fütterung entnommen, die folgenden Proben nach der Fütterung mit Rotatorien bzw. *Artemia*-Nauplien. Nach der ersten Fütterung mit Rotatorien zeigt sich schon in der nächsten Probe nach etwa einer Stunde eine Zunahme der Trypsinaktivität. Die Abb. 78 I-III zeigt die Reaktion auf Futterzugabe bei drei verschiedenen alten Futtergruppen (von oben: 30, 37 und 42 Tage alt). Nach etwa 2 Stunden nimmt die Aktivität ab und steigt dann 2 Stunden später wieder leicht an, ohne dass eine Futterzugabe erfolgt war. Die Zugabe von *Artemia*-Nauplien führt erneut zu einer deutlichen Erhöhung der Trypsinaktivität. Nach weiteren 2-3 Stunden fällt die Trypsinaktivität wieder auf das morgendliche Niveau vor der ersten Fütterung zurück, ausser bei den 42 Tage alten Larven. Die Grafik zeigt zum Vergleich den für das jeweilige Alter typischen mittleren Wert für die Trypsinaktivität von hungernden Heringslarven. Zu keinem Zeitpunkt fallen die Trypsinaktivitätswerte unter dieses Niveau. Da die Trypsinaktivität in diesem Entwicklungsstadium sehr eng mit der Larvenlänge gekoppelt

ist, wurde geprüft, ob die Veränderung der Trypsinaktivität auf unterschiedlich grosse Larven in den Proben zurückzuführen ist. Dazu wurde die mittlere Länge für jede Probe berechnet und als Balkengrafik in die Abbildungen eingefügt. Bei keinem der 3 Experimente gibt es einen Hinweis darauf, dass die Änderungen der Trypsinaktivität auf signifikant unterschiedlich grosse Heringslarven in den Proben zurückzuführen ist.

Wiederaanfütterung nach einer Hungerperiode

In einem anderen Versuch wurde bei 37 Tage alten Heringslarven geprüft, wie sich die Trypsinaktivität bei Wiederaanfütterung nach 4 Tagen Futterentzug im zeitlich kleinskaligen Bereich (Stundenrhythmus) verhält.

In diesem Experiment wurde die erste Larvenprobe morgens vor der ersten Fütterung nach 4 Tagen Futterentzug entnommen. Die Trypsinaktivität zeigt Werte, wie sie im Mittel bei hungernden Parallelproben gefunden wurden (Abb. 79). Bei den Larven, die etwa eine halbe Stunde nach der ersten Fütterung mit Rotatorien (B, *Brachionus plicatilis*, 5 ml⁻¹) entnommen wurden, zeigt sich bereits zu diesem Zeitpunkt ein deutlicher Anstieg der Trypsinaktivität, der noch bis etwa 2 Stunden nach der Erstfütterung anhält. Nach 4 Stunden ist die Trypsinaktivität wieder auf den morgendlichen Ausgangswert gefallen, der auf dem Niveau der gleichaltrigen hungernden Heringslarven liegt. Nach der Fütterung mit *Artemia*-Nauplien (A, *Artemia spec.*, 1 ml⁻¹) steigt die Trypsinaktivität innerhalb einer Stunde wieder auf ein Niveau, wie es bereits nach der ersten Fütterung gemessen wurde. Nach weiteren 2 Stunden verringert sich die Trypsinaktivität zwar wieder, aber der gemessene Wert liegt oberhalb des entsprechenden Hungerniveaus. Diese 37 Tage alten Heringslarven haben innerhalb von etwa 10 Stunden nach der Wiederaanfütterung ihre Verdauungsenzymkapazität wieder auf einem Niveau stabilisieren können, das dem von kontinuierlich gefütterten Larven entspricht. 4 Tage Futterentzug führen offenbar bei Heringslarven in diesem Alter noch nicht zu sekretorischen Defekten ("Point-of-no-return", PNR, Blaxter & Ehrlich 1974, Yin & Blaxter 1987, Oozeki et al. 1989). Bei der Kontrolle der mittleren Larvenlänge, in der Abbildung als Balken dargestellt, ergeben sich keine Hinweise auf signifikante Unterschiede.

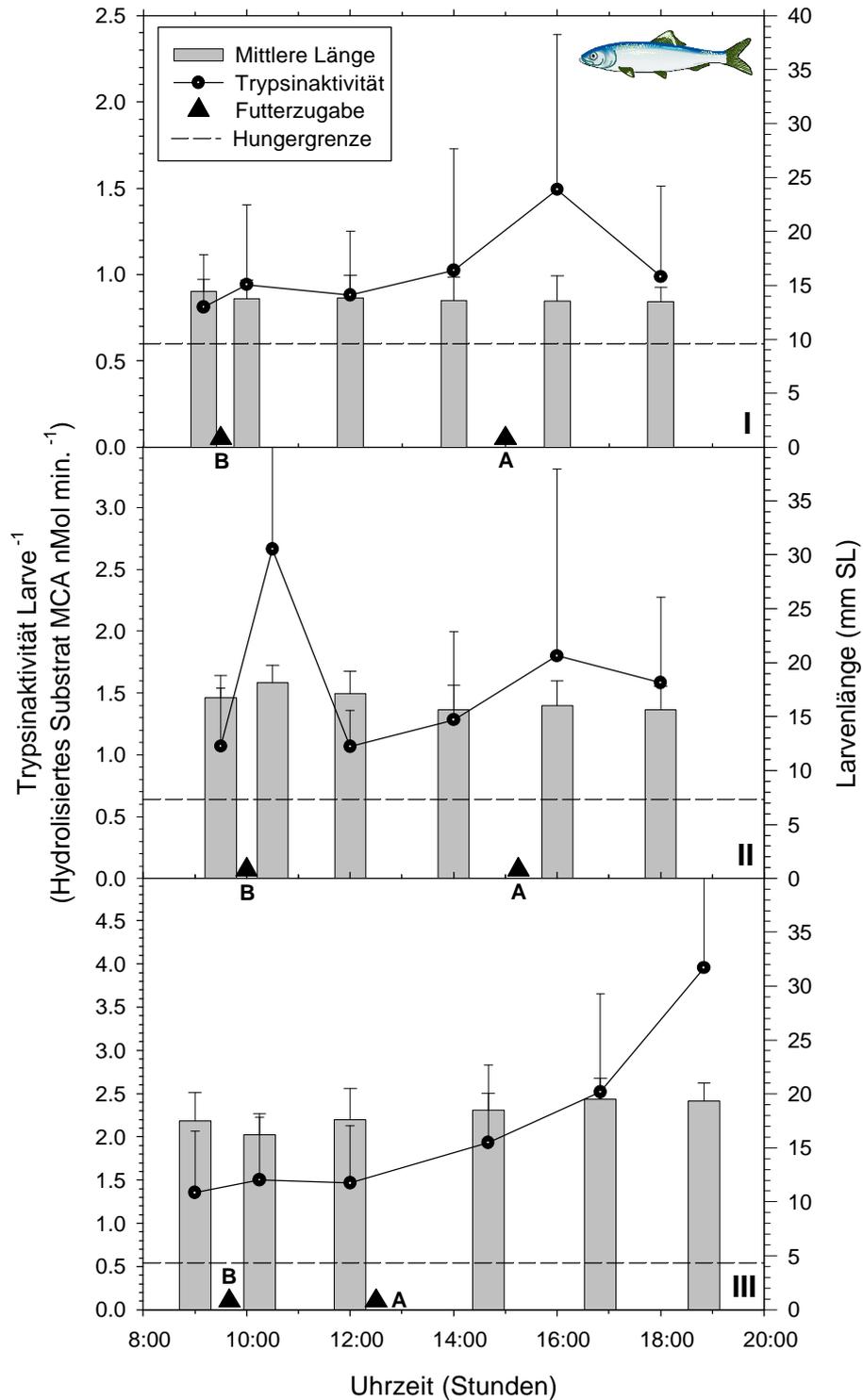


Abb. 78: Tagesrhythmisches Muster der Trypsinaktivität in Beziehung zu Futter und Fütterungszeit. Die 30 (I), 37 (II) und 42 (III) Tage alten Larven wurden im Labor aufgezogen und kontinuierlich gefüttert. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Fütterung mit Rotatorien (B, *Brachionus plicatilis*, 5 ml⁻¹) und Artemia-Nauplien (A, 1ml⁻¹). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-15 individuellen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit der Standardabweichung. Die gestrichelte Linie entspricht der jeweiligen mittleren Trypsinaktivität bei hungernden Larven entsprechenden Alters.

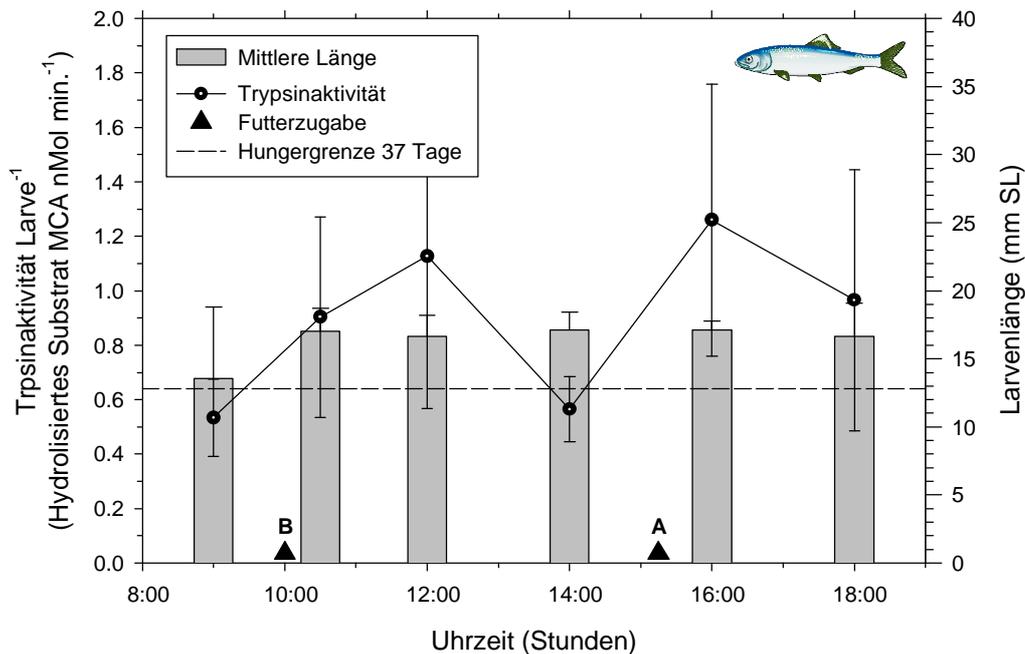


Abb. 79: Tagesrhythmisches Muster der Trypsinaktivität nach 4 Tagen Futterentzug und Wiederanfütterung bei 37 Tage alten Heringslarven. Die Larven wurden im Labor zunächst bei hoher Futterdichte aufgezogen und vor Beginn dieses Versuchs 4 Tage lang unter Futterentzug gehalten. Nach einer ersten Probennahme wurden die Larven wieder gefüttert. Die Pfeile verweisen auf den Zeitpunkt der Fütterung mit Rotatorien (B, *Brachionus plicatilis*, 5 ml⁻¹) und *Artemia*-Nauplien (A, *Artemia spec.*, 1 ml⁻¹). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-15 individuellen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit der Standardabweichung. Die gestrichelte Linie entspricht der mittleren Trypsinaktivität bei hungernden Larven entsprechenden Alters.

3.2.2.2 Steinbutt (*Scophthalmus maximus* L.)

Die tageszeitliche Änderung der Trypsinaktivität wurde bei kontinuierlich gefütterten, 12 Tage alten Steinbuttlarven in Abhängigkeit vom Fütterungszeitpunkt und der Fütterungsfrequenz untersucht. Diese Steinbuttlarven wurden in den Anlagen der Firma BUTT aufgezogen (Abb. 80).

Die erste Probe wurde bei diesem Experiment vor der ersten Fütterung entnommen. Nach der Fütterung mit Rotatorien (angereicherte *Brachionus plicatilis*, 5-10 ml⁻¹) konnte schon in der nächsten Probe nach ca. 30 min. ein Anstieg der Trypsinaktivität beobachtet werden, der nach ca. 2 Stunden einen ersten Maximalwert erreichte. In der nächsten Probe eine Stunde später ist dann wieder eine Verringerung der Trypsinaktivitäten zu beobachten. Nach der zweiten Fütterung mit Rotatorien reagieren die Larven erneut im zeitlichen Rahmen von etwa einer halben Stunde mit einer Erhöhung der Trypsinaktivität. Nach ca. 2 Stunden ist dann wiederum ein Rückgang der Trypsinaktivität festzustellen, vergleichbar mit dem Muster nach der ersten Fütterung. Eine dritte Futterzugabe von Rotatorien hat keinen

sichtbaren Effekt mehr auf die Trypsinaktivität. Die Verdauungsenzymkapazität scheint nach der zweiten Futterzugabe bereits maximal ausgenutzt worden zu sein. Nach etwa 10 Stunden ist die Trypsinaktivität wieder auf das morgendliche Niveau vor der ersten Fütterung abgefallen. Die Trypsinaktivität liegt immer deutlich oberhalb der Trypsinaktivität wie sie im Mittel für etwa gleichaltrige Steinbuttlarven in Hungerexperimenten bestimmt wurde. Die mittleren Längen der einzelnen Proben sind als Balken dargestellt, signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen wurden hierbei nicht festgestellt.

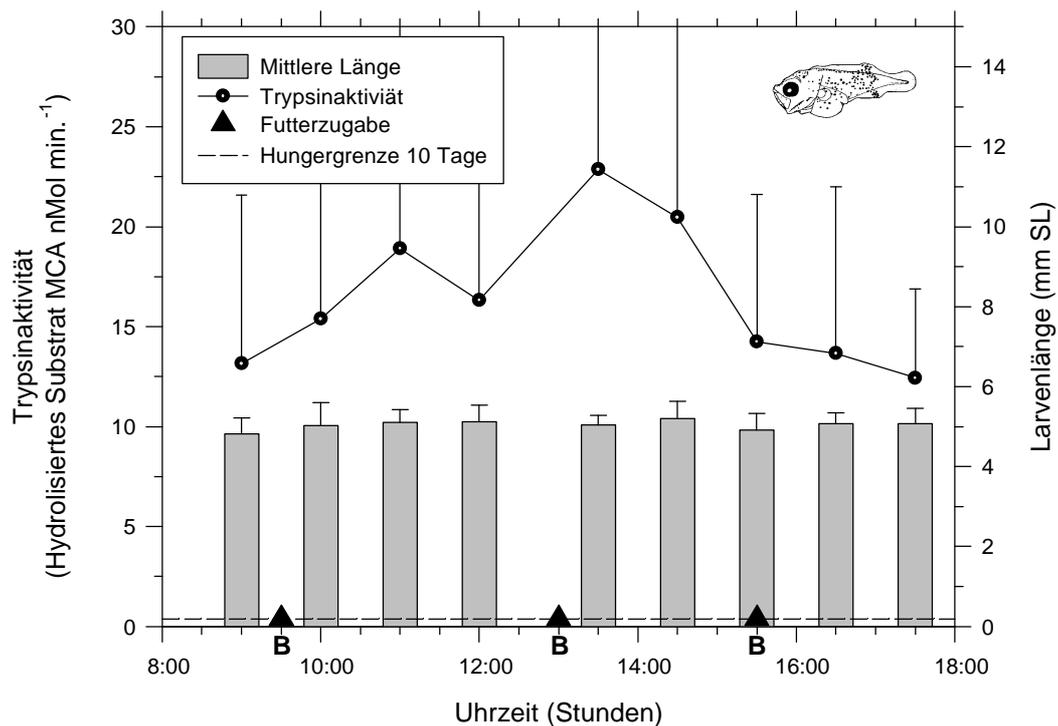


Abb. 80: Tageszeitliches Verhalten der Trypsinaktivität in Beziehung zur Futterzeit und Fütterungsfrequenz. Die 12 Tage alten Steinbuttlarven waren vor diesem Versuch kontinuierlich gefüttert worden. Die Pfeile verweisen auf den jeweiligen Zeitpunkt der Fütterung mit angereicherten Rotatorien (B, *Brachionus plicatilis*, Futterdichte 5-10 ml⁻¹). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-15 individuellen Messungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den Standardabweichungen. Die gestrichelte Linie entspricht der mittleren Trypsinaktivität bei 10 Tage alten, hungernden Steinbuttlarven.

Wiederanfütterung nach einer Hungerperiode

Wie bei Heringslarven wurde auch bei Steinbuttlarven die tageszeitliche Änderung der Trypsinaktivität an zwei verschiedenen alten Gruppen nach 2 bzw. 3 Tagen Futterentzug untersucht.

Die Abb. 81 zeigt die Ergebnisse für eine 19 Tage alte Gruppe, die vor der Wiederanfütterung 2 Tage lang unter Futterentzug gehalten wurde. Die erste Trypsinmessung erfolgte an einer Probe, welche vor der ersten Fütterung entnommen wurde. Diese Trypsinaktivität liegt

auf dem mittleren Niveau für hungernde Steinbuttlarven entsprechenden Alters. Nach der Fütterung mit *Artemia*-Nauplien (Futterdichte 1 ml^{-1}) ist in der Probe, die eine Stunde nach Futterzugabe entnommen wurde, bereits eine deutliche Steigerung der Trypsinaktivität zu erkennen. Die Trypsinaktivität verbleibt zunächst auf einem relativ konstanten Niveau, erreicht dann aber in der nach etwa 6 Stunden nach der Fütterung entnommenen Probe einen etwa 20fach höheren Wert, ohne dass eine weitere Futterzugabe erfolgt war. Nach etwa 10 Stunden sinkt die Trypsinaktivität auf einen Wert, der etwa den ersten 3 Werten entspricht, die nach der Futterzugabe gemessen wurden. In einer weiteren Probe nach 24 Stunden vor einer erneuten Fütterung ist die Trypsinaktivität immer noch deutlich höher als bei der vergleichbaren ersten Probe nach der Hungerperiode.

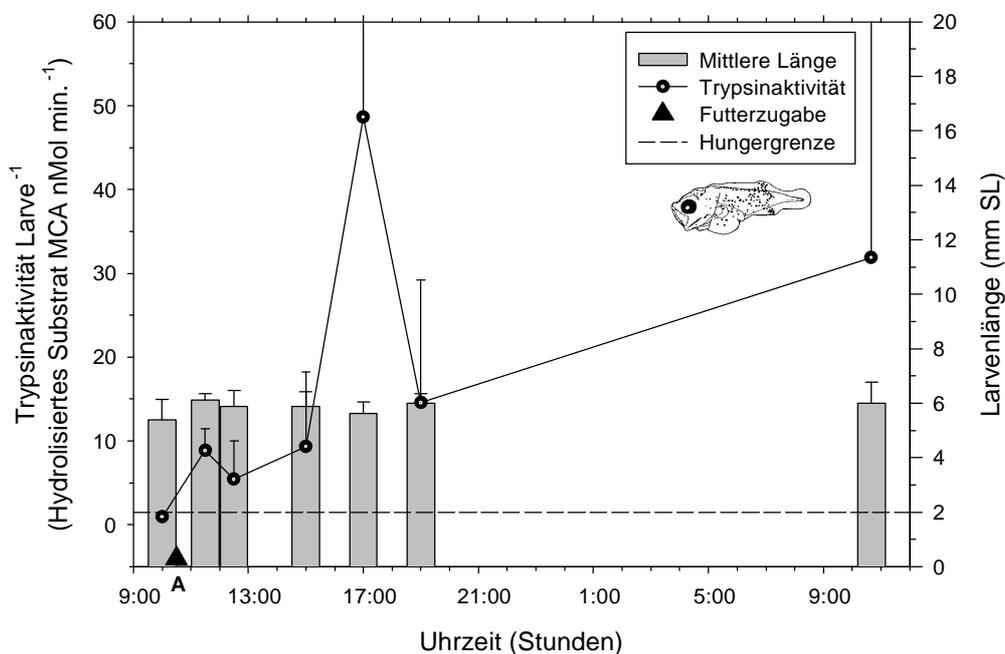


Abb. 81: Tageszeitliches Muster der Trypsinaktivität bei 19 Tage alten Steinbuttlarven nach 2 Tagen Futterentzug und Wiederanfütterung. Die Larven waren im Labor zunächst bei hoher Futterdichte aufgezogen worden. Vor der Probennahme wurden die Larven 2 Tage lang unter Futterentzug gehalten und nach der ersten Probennahme wieder gefüttert. Der Pfeil verweist auf den Zeitpunkt der Fütterung mit *Artemia*-Nauplien (A, 1 ml^{-1}). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-15 individuellen Messungen mit den Standardabweichungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die gestrichelte Linie entspricht der mittleren Trypsinaktivität bei hungernden Steinbuttlarven entsprechenden Alters.

Analog zu dem oben beschriebenen Experiment mit 19 Tage alten Steinbuttlarven wurde ein Versuch mit 26 Tage alten, kurz vor der Metamorphose stehenden Steinbuttlarven durchgeführt (Abb. 82). Die Trypsinaktivität in der ersten Probe vor der Fütterung lag knapp unterhalb des Niveaus für hungernde Steinbuttlarven desselben Alters. Nach der Fütterung mit *Artemia*-Nauplien wurde eine Zunahme der Trypsinaktivität beobachtet, welche in die-

sem Experiment bis zur letzten Probe annähernd linear anstieg. Ein Einfluss durch unterschiedliche Larvengrößen in den Proben konnte nicht festgestellt werden.

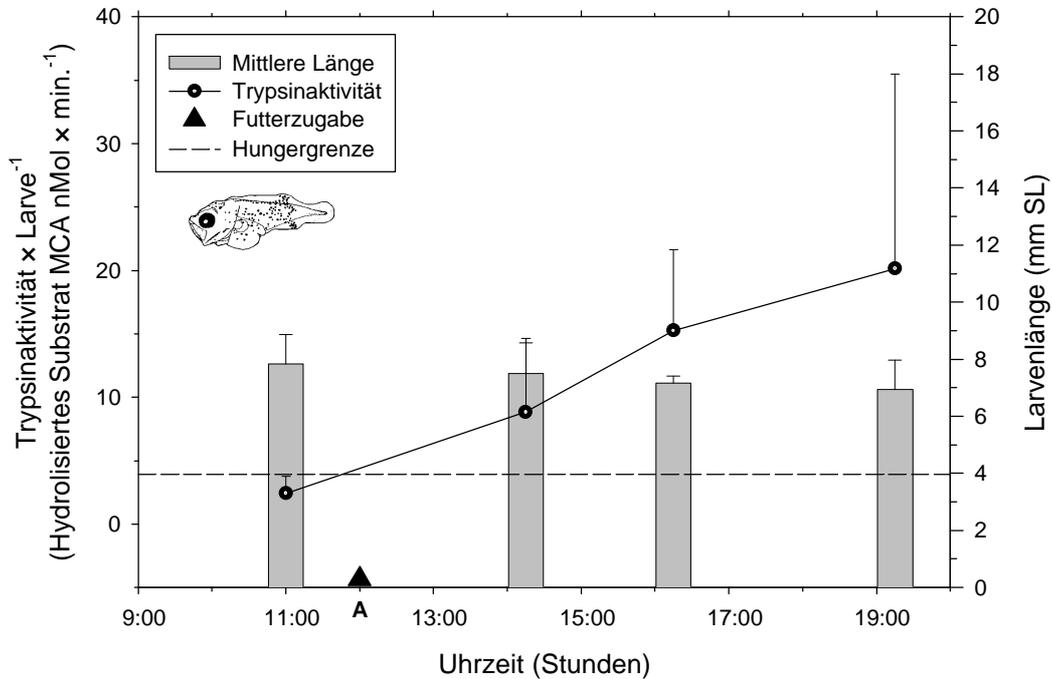


Abb. 82: Tageszeitliches Muster der Trypsinaktivität bei 26 Tage alten Steinbuttlarven nach 3 Tagen Futterentzug und Wiederanfütterung. Die Larven waren im Labor zunächst bei hoher Futterdichte aufgezogen worden. Vor der Probennahme wurden die Larven 3 Tage unter Futterentzug gehalten und nach der ersten Probennahme wieder gefüttert. Der Pfeil verweist auf den Zeitpunkt der Fütterung mit *Artemia*-Nauplien (A, 1 ml⁻¹). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-15 individuellen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die gestrichelte Linie entspricht der mittleren Trypsinaktivität hungernder Larven entsprechenden Alters.

3.2.2.3 Dorsch (*Gadus morhua* L.)

In einem Experiment mit 12 Tage alten Dorschlarven wurden die tageszeitlichen Änderungen der Trypsinaktivität unter dem Einfluss von 3 unterschiedlichen Futterdichten untersucht. Dorschlarven, die bis zum Beginn des Experiments bei einer Futterdichte von 4 Rotatorien ml⁻¹ (*Brachionus plicatilis*) aufgezogen wurden, waren die Basis für dieses Experiment. Aus diesem Pool wurden Larven entnommen und unter 3 verschiedenen Futterkonditionen gehalten (hohe Futterdichte 4 ml⁻¹, geringe Futterdichte 0.4 ml⁻¹ und eine Hungergruppe) Über einen Zeitraum von insgesamt etwa 24 Stunden wurden diese 3 Versuchsgruppen dann etwa alle 3 Stunden beprobt⁵ (Abb. 83).

⁵ Diese Proben wurden vom Danish Institute for Fisheries (Mike St. John), Chalottenlund im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

Die erste Probe wurde nur aus der Gruppe mit hoher Futterdichte vor der Fütterung entnommen (diese Probe definiert die Trypsinaktivität zu Beginn des Experiments für die beiden Futtergruppen, die Hungergruppe wurde vor Beginn des Experiments bereits einen Tag unter Futterentzug gehalten). Nach der Fütterung wurden dann Parallelproben aus allen drei Gruppen entnommen. Die gefütterten Larven reagieren mit einem Anstieg der Trypsinaktivität, welche 6 Stunden nach der Fütterung einen Maximalwert erreicht. Die Gruppe mit der geringen Futterdichte zeigt im Vergleich zum Ausgangswert einen gleichbleibenden Wert, während die Hungergruppe eine deutlich geringere Trypsinaktivität aufweist. Von der nächsten Probennahme etwa 9 Stunden nach der Fütterung bis zur letzten Probennahme nach etwa 24 Stunden zeigen alle 3 Gruppen ungefähr das gleiche Trypsinaktivitätsniveau. Ein Einfluss durch unterschiedlich grosse Larven kann ausgeschlossen werden, da keine signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren Längen der einzelnen Proben festgestellt wurden.

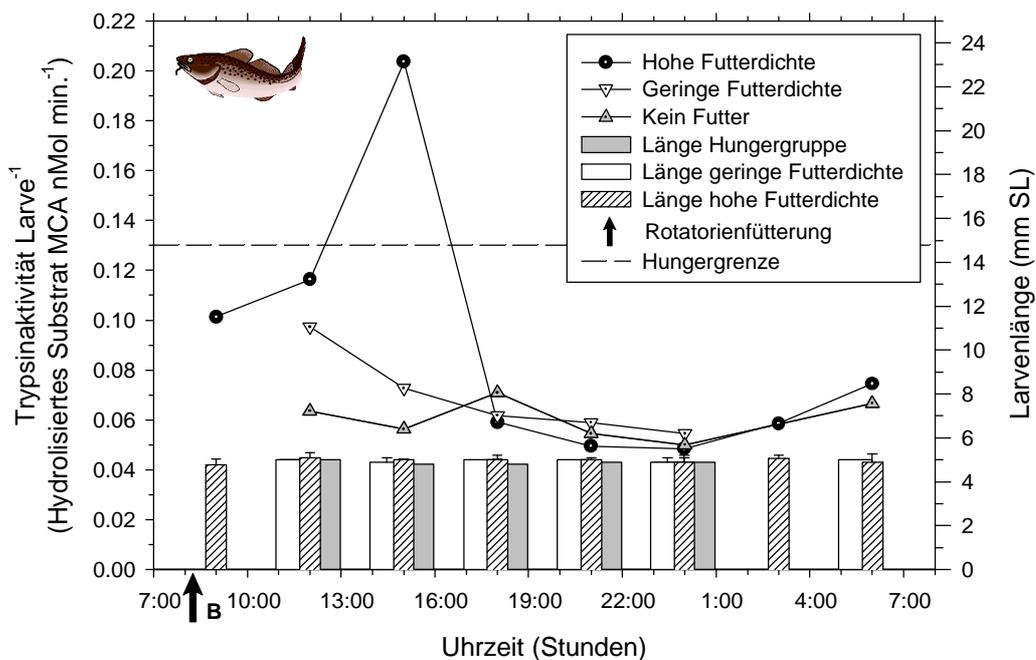


Abb. 83: Tageszeitlicher Rhythmus der Trypsinaktivitäten bei 16 Tage alten Dorschlarven unter dem Einfluss von 3 verschiedenen Futterdichten (*Brachionus plicatilis*, hohe Futterdichte 4 ml^{-1} , geringe Futterdichte 0.4 ml^{-1} und eine Hungergruppe). Der Pfeil verweist auf den Zeitpunkt der Fütterung mit Rotatorien. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 7-10 (hohe Futterdichte), 5-10 (geringe Futterdichte) und 2-10 (Hungergruppe) individuellen Messungen. Auf eine Darstellung der Standardabweichungen wurde zur Erhaltung der Übersicht verzichtet. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den Standardabweichungen. Die gestrichelte Linie entspricht der mittleren Trypsinaktivität hungernder Dorschlarven entsprechenden Alters aus den Kalibrierungsexperimenten.

Alle gemessenen Trypsinaktivitäten, bis auf eine Ausnahme bei der Gruppe mit hoher Futterdichte, sind im Vergleich geringer als der Grenzwert für hungernde Dorschlarven ent-

sprechenden Alters aus der Laborkalibrierung (vergl. 3.2.1.3). Die Dorschlarven für die Kalibrierung wurden mit angereicherten Rotatorien und bereits nach acht Tagen zusätzlich mit *Artemia*-Nauplien gefüttert (vergl. 2.2.2.3). Dagegen waren die Dorschlarven für das Experiment zur tageszeitlichen Änderung der Trypsinaktivität bis zum 16. Tag nur mit Rotatorien gefüttert worden. Die deutlich geringeren Trypsinaktivitäten bei diesen Larven kann beispielsweise bedeuten, dass die Dorschlarven vor und während dieses Experiments unter suboptimalen Fütterungsbedingungen aufgezogen worden sind, so dass die Verdauungsenzymkapazität nicht optimal entwickelt und ausgenutzt werden konnte.

3.3 Trypsinaktivitätsbestimmung - Feldproben

Im folgenden Teil werden Ergebnisse zur Analyse der Trypsinaktivität an Fischlarven aus den Feldproben verschiedener Arten vorgestellt. Den Schwerpunkt in diesem Kapitel bildet die Konditionsanalyse bei den Fischlarven folgender Arten: Hering (*Clupea harengus*), Sprotte (*Sprattus sprattus*), brasilianische Sardine (*Sardinella brasiliensis*), Dorsch (*Gadus morhua*) und Schellfisch (*Melanogrammus aeglefinus*). Mit Hilfe dieser Anwendungen sollte die Brauchbarkeit des Indikators Trypsinaktivität zur Beurteilung des Ernährungszustandes von Fischlarven in Feldproben geprüft werden. Zur Abschätzung des Anteils hungernder Larven in den Feldproben werden die jeweiligen Kalibrierungsdaten aus den Laboraufzuchten der entsprechenden Arten verwendet. Als massgeblicher Grenzwert wurde jeweils der Vorhersagebereich (95%) der an die ungefütterten Larven angepassten Regressionsgeraden definiert. Dieser Grenzwert entspricht etwa der zweifachen Standardabweichung und schliesst einen Bereich ein, in dem bei einer Wiederholung des entsprechenden Kalibrierungsexperiments wiederum 95% der Werte von hungernden Larven zu finden sein würden.

Daneben werden Ergebnisse von Experimenten mit Heringslarven aus der Schlei vorgestellt, mit denen unter Laborbedingungen Versuche durchgeführt werden konnten, sowie einige Studien an Sprotten- und Sardinienlarven zur Tagesrhythmik der Trypsinaktivität unter natürlichen Bedingungen.

3.3.1 Hering (*Clupea harengus* L.)

Insgesamt konnten für diese Untersuchung Feldproben aus 4 Laichgebieten der Heringe miteinander verglichen werden. Die Ergebnisse für die verschiedenen Gebiete wurden in den folgenden Grafiken der besten Übersichtlichkeit folgend angeordnet.

Für die Abschätzung hungernder Heringslarven in den Feldproben wurde die Laborkalibrierung für 4-9 Tage hungernde Heringslarven an eine Regressionsgerade angepasst und der 95%-Vorhersagebereich der Regression als Kriterium zur Beurteilung des Ernährungszustandes definiert. Die Abb. 84a zeigt das Ergebnis für die Abschätzung des Anteils hungernder Heringslarven in einer Probe aus dem Englischen Kanal im Januar (Stat. AD 98). Gezeigt werden die individuellen Trypsinaktivitäten für die Larven aus der Feldprobe. Alle Larven, deren Werte für die Trypsinaktivität in den Vorhersagebereich der Regression fallen,

gelten als hungernd. In diesem Fall wurden 27.9% der Heringslarven als hungernd eingestuft. In der Abb. 84b werden die Ergebnisse für Feldproben aus dem Orkney-Shetland und Hebriden-Gebiet gezeigt. Die Station POS 510 liegt nördlich von Schottland, die Station POS 703 nordwestlich von Schottland.

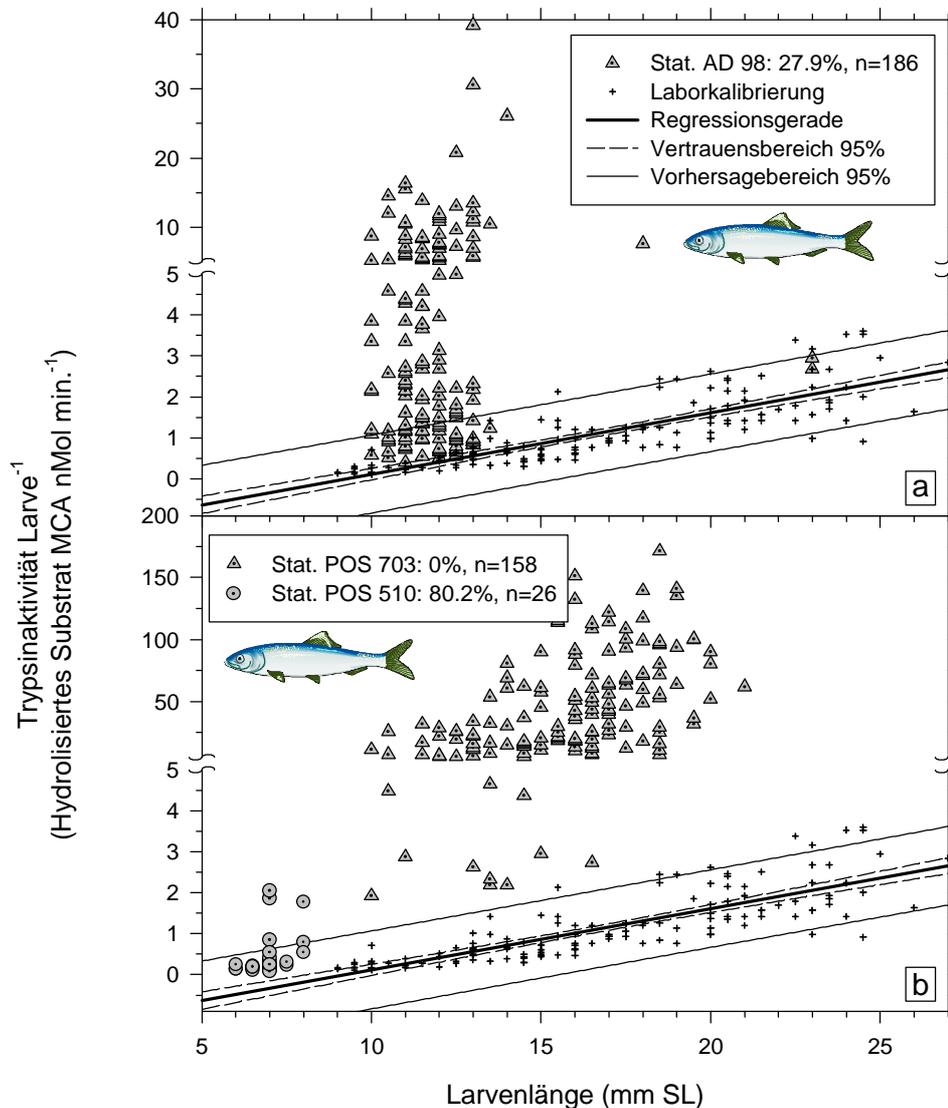


Abb. 84 a & b: Abschätzung des Anteils hungernder Heringslarven in Feldproben aus dem Englischen Kanal (Stat AD 98) im Januar sowie aus dem Orkney-Shetland und Hebriden-Gebiet im September (Stat. POS 703 & 510). Die Symbole repräsentieren individuelle Messwerte von Heringslarven aus den jeweiligen Feldproben. Die Regressionsgerade mit dem 95%-Vorhersagebereich der Regression wurde aus den Werten für 4-9 Tage hungernde Heringslarven im Laborversuch berechnet und dient als Kriterium für die Beurteilung des Ernährungszustandes der Feldlarven. Auf dieser Basis wurden in der Probe von Stat. AD 98 27.9% der Heringslarven als hungernd klassifiziert, in der Probe von Stat. POS 703 keine und von der Stat. POS 510 80.2% der Heringslarven als hungernd klassifiziert. Zur besseren Auflösung des kritischen Bereichs wurde die Skalierung der Ordinate geteilt.

Die Proben von der Station POS 703 wurden während eines Driftexperiments gefangen. In diesen Proben wurden anteilig mehr grössere Heringslarven gefunden, verglichen mit den Proben aus dem Englischen Kanal und den Stat. 510 und 511 (s.u.). Hungernde Heringslarven konnten in diesen Feldproben nicht festgestellt werden. Bei den Proben von Station POS 510 handelt es sich um noch sehr kleine Larven, in dieser Probe wurden 80.2% hungernde Larven ermittelt. In der Feldprobe von der Stat. POS 511, die ebenfalls nördlich von Schottland liegt, wurden, wie bei der Stat. POS 510, nur Heringslarven unter 10 mm Länge gefunden. Bei dieser Probe wurden über den 95%-Vorhersagebereich der Regression 36.6% hungernde Heringslarven berechnet. In der Probe aus dem Nord-Ostsee-Kanal wurden 21.6% hungernde Larven gefunden, wobei auch grössere Larven betroffen sind (Abb. 85). Bei dieser Probe wurden sehr unterschiedliche Larvenlängen festgestellt, was in der Abgeschlossenheit dieses Laichgebietes begründet sein kann. Hier können sich möglicherweise mehrere Larvengenerationen mischen, bevor die Trennung durch eine aktive Abwanderung der älteren Larven stattfindet. Der Grössenbereich ist jedoch vergleichbar mit dem der Proben von der Station POS 703.

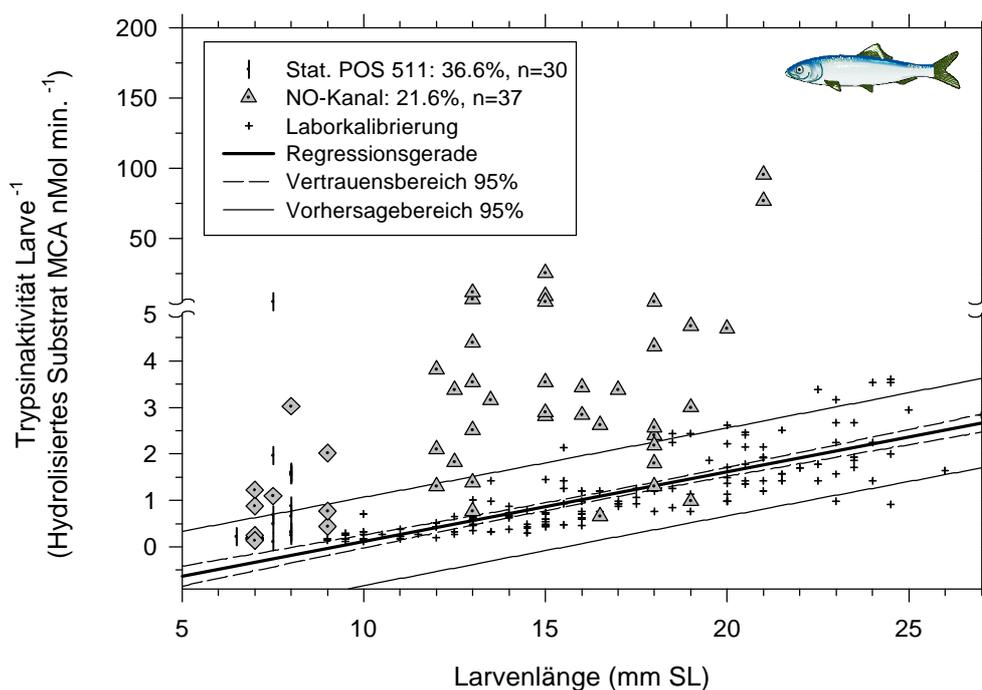


Abb. 85: Abschätzung des Anteils hungernder Heringslarven in einer Feldprobe nördlich von Schottland im September, Stat. POS 511, und einer Probe aus dem Nord-Ostsee-Kanal im Mai. Die Symbole repräsentieren individuelle Messwerte von Heringslarven aus den Feldproben. Die Regressionsgerade mit dem 95%-Vorhersagebereich der Regression wurde aus den Werten für 4-9 Tage hungernde Heringslarven im Laborversuch berechnet und dient als Kriterium für die Beurteilung des Ernährungszustandes der Feldlarven. Auf dieser Basis wurden in der Probe von Stat. POS 511 36.6% und in der Probe aus dem Nord-Ostsee-Kanal 21.6% der Heringslarven als hungernd klassifiziert. Zur besseren Auflösung des kritischen Bereichs wurde die Skalierung der Ordinate geteilt.

Heringslarven aus der Schlei

Natürlich aufgewachsene Heringslarven wurden in der Schlei zweimal im Juni im Abstand von einer Woche mit einem Senknetz gefangen und lebend in das Labor transportiert. Dort wurden sie in dieselbe Hälterungsanlage eingesetzt, die für die Kalibrierungsexperimente mit im Labor aufgezogenen Heringslarven verwendet wurde. Sofort nach der Umsetzung wurden mehrere Experimente mit diesen Larven durchgeführt. Bei zwei Gruppen wurde die Reaktion der Trypsinaktivität bei Futterentzug geprüft. Eine weitere Gruppe wurde zunächst mit *Artemia*-Nauplien gefüttert, und es wurde dann die Reaktion der Trypsinaktivität auf Futterentzug bei dieser Gruppe geprüft.

Bei allen Proben handelte es sich um sehr grosse Larven mit einer Standardlänge von 16.5 bis zu 29 mm. Verglichen mit den Längen der Heringslarven aus der Laboraufzucht lagen diese Larven am oberen Ende der Grössenskala. Exemplarische Altersbestimmungen über die Otholithenanalyse bei einigen Heringslarven aus der Schlei ergaben, dass Larven von der ersten Probennahme mit einer mittleren Länge von 24.15 mm etwa 45 bis 48 Tage alt waren (Ndomahina 1988). Die Heringslarven aus der Laboraufzucht waren bei einer vergleichbaren Länge bereits 60 bis 65 Tage alt.

Die Abb. 86a & b und zeigen die Ergebnisse für die Heringslarven aus der Schlei, die im Labor bis zu 13 Tagen unter Futterentzug gehalten wurden. Obgleich die mittlere Trypsinaktivität in der zweiten Feldprobe anfänglich geringer ist als die der ersten Feldprobe (um etwa 45%), sind die mittleren Werte bei beiden Feldproben immer noch deutlich höher als die Trypsinaktivität von etwa gleichgrossen (24-26 mm), gefütterten Heringslarven aus der Laboraufzucht (vergl. 3.2.1.1) Nach Beginn der Hungerperiode ist in den Proben vom 3. bzw. 5. Tag eine deutliche Reduktion der Trypsinaktivitäten zu beobachten sowie ein im weiteren Verlauf bis zum Ende der Experimente fast konstantes Niveau. Dieses plateauartige Niveau ist bei beiden Versuchen etwa gleich niedrig. Die Abnahme der Trypsinaktivität kann bis zum Beginn des plateauartigen Verlaufs am besten als exponentielle Abnahme beschrieben werden. Die geringsten Trypsinwerte liegen bei den Larven aus der Schlei noch knapp oberhalb des Niveaus gleichgrosser hungernder Heringslarven aus der Laboraufzucht. Die individuelle Variabilität bei der Trypsinaktivität (gezeigt als Standardabweichung) ist bei den hungernden Larven deutlich geringer als bei den frisch gefangenen Larven der Feldprobe. Der Vergleich der mittleren Grössen zwischen den einzelnen Proben gibt keinen Anhaltspunkt für einen signifikanten Einfluss der Larvengrösse auf die Ergebnisse der Trypsinaktivitätsmessungen bei diesem Experiment.

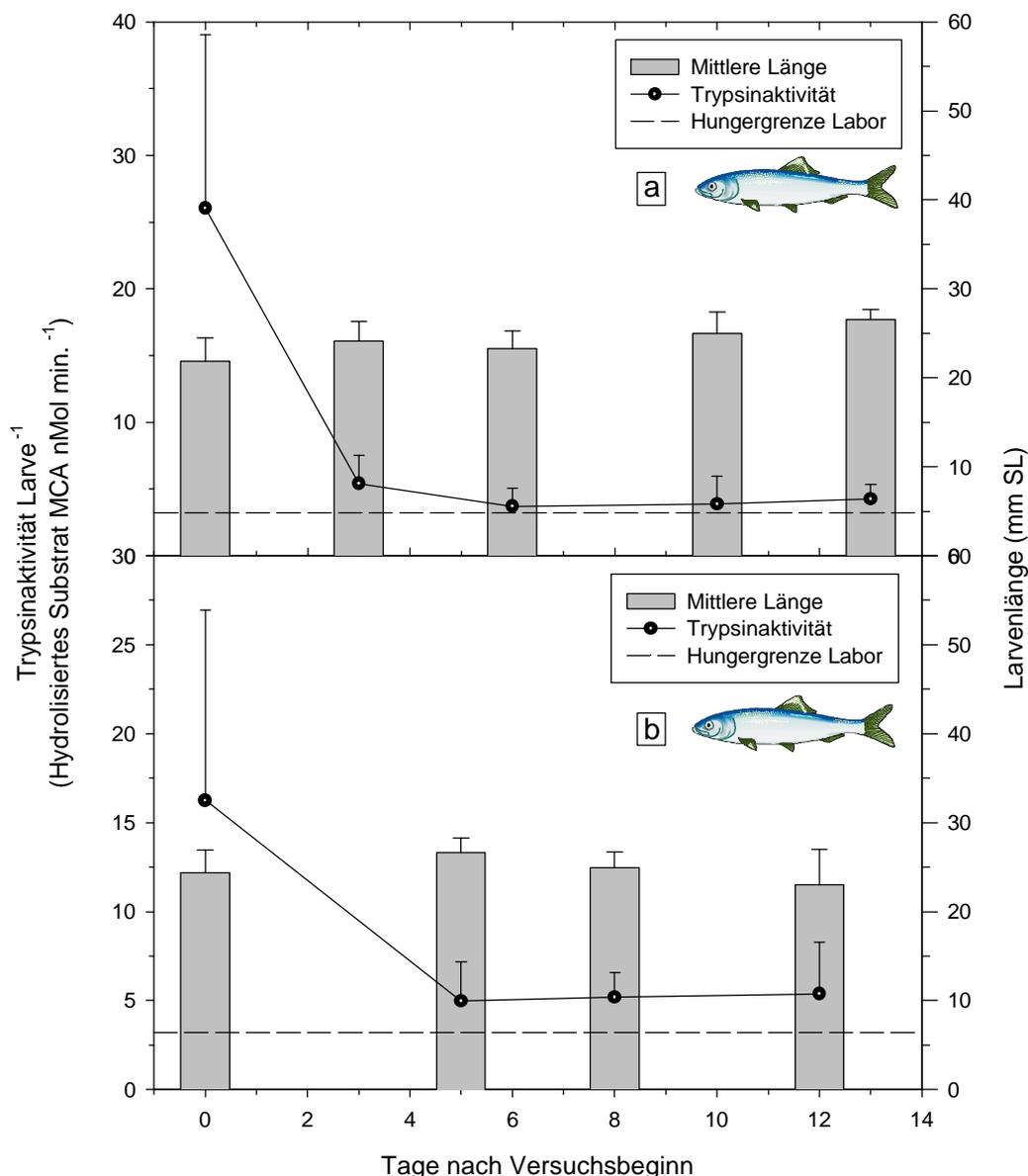


Abb. 86a & b: Laborversuche mit Heringslarven aus der Schlei. Die Heringslarven wurden im Abstand von einer Woche in der Schlei gefangen. Der erste Messwert zeigt die Trypsinaktivität der direkt aus dem Feld entnommenen Probe (Tag 0). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von individuellen Messungen an 3-10 Larven und werden mit den Standardabweichungen für die Mittelwerte gezeigt. Die gestrichelte Linie zeigt den Grenzwert für 26 mm grosse, hungernde Heringslarven aus der Laborkaufzucht. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die mittlere Länge aller Larven im ersten Experiment ist 24.15 mm, im zweiten Experiment 24.74 mm.

In einem weiteren Experiment mit Heringslarven aus der Schlei wurde die Reaktion der Trypsinaktivität von natürlich aufgewachsenen Larven auf die Fütterungskonditionen im Labor geprüft. Diese Proben stammten aus der zweiten Probennahme (Abb. 87). Der Initialwert der Trypsinaktivität aus der Feldprobe ist deshalb identisch mit dem Wert aus dem

oben beschriebenen Experiment. Nach 4 Tagen Fütterung mit *Artemia*-Nauplien unter den Laborstandardbedingungen (vergl. 2.2.2.1) zeigte sich, im Gegensatz zu den Erwartungen, eine umgekehrte Reaktion: die Trypsinaktivität hatte um etwa 42% abgenommen, vergleichbar mit der Reaktion bei den oben beschriebenen Hungerexperimenten an den Heringslarven aus der Schlei. Nach weiteren 3 Tagen Fütterung hatte sich die Trypsinaktivität dann aber etwa vervierfacht und lag noch oberhalb des Initialwertes der Feldprobe. Nach dieser Probe wurde die Fütterung eingestellt. Nach 3 Tagen unter Hungerbedingungen hatte sich die Trypsinaktivität wiederum um etwa 45% reduziert und entsprach etwa der Trypsinaktivität in der ersten Laborprobe. Die individuelle Variabilität der Trypsinaktivität ist bei den gefütterten Gruppen grösser als bei der Hungergruppe. Die Mittelwerte der Längen für die einzelnen Proben sind nicht signifikant unterschiedlich ($p < 0.05$). Ein Einfluss der Larvengrösse auf die Messwerte ist daher nicht erkennbar.

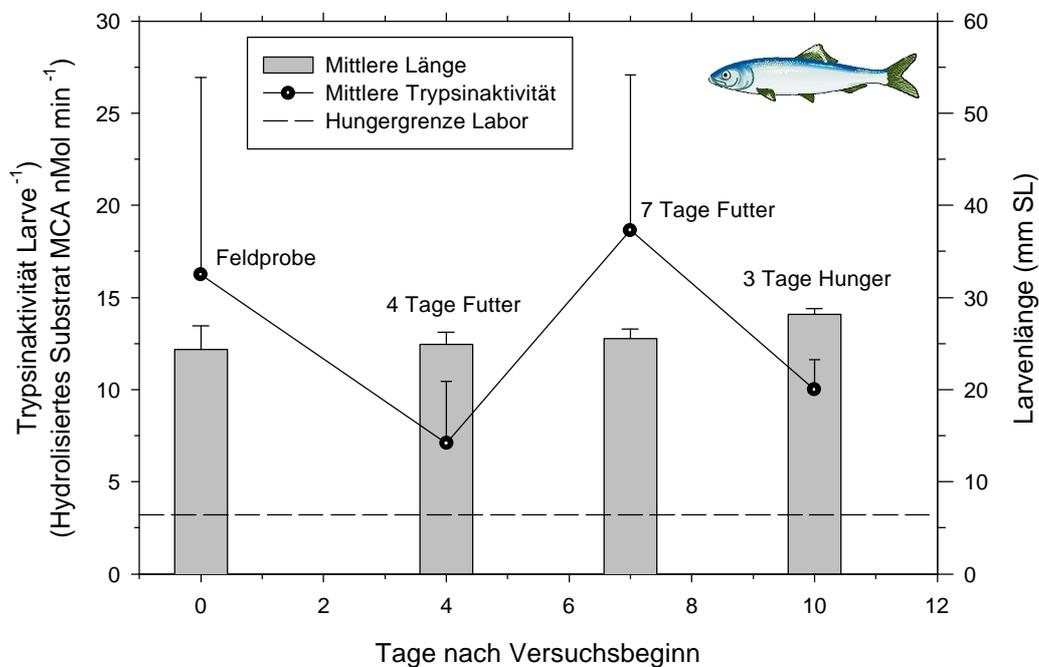


Abb. 87: Trypsinaktivität bei Heringslarven aus der Schlei, die im Labor erst 7 Tage mit *Artemia*-Nauplien gefüttert wurden (Futterdichte 1 ml^{-1}) und dann 3 Tage unter Futterentzug gehalten wurden. Die erste Probe repräsentiert die Trypsinaktivität der direkt aus der Schlei entnommenen Feldprobe (Tag 0). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von individuellen Messungen an 5-11 Larven und werden mit den Standardabweichungen um den Mittelwert gezeigt. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Grenzwert für 26 mm grosse Heringslarven aus der Laboraufzucht. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die mittlere Länge aller Larven betrug 26.1 mm.

3.3.2 Dorsch (*Gadus morhua* L.)

Bei einigen Dorschlarven aus dem Bornholmbecken wurde exemplarisch unter Anwendung der Laborkalibrierung der Ernährungszustand geprüft (Abb. 88). Als Beurteilungskriterium wurde die obere Grenze des 95%-Vorhersagebereich der Regressionsgeraden herangezogen, die im Laborexperiment für hungernden Dorschlarven ermittelt worden war. Danach können 30.8% der Dorschlarven in dieser Feldprobe als hungernde Larven identifiziert werden. Auch grössere Larven sind dabei im Vorhersagebereich zu finden und als hungernd einzustufen.

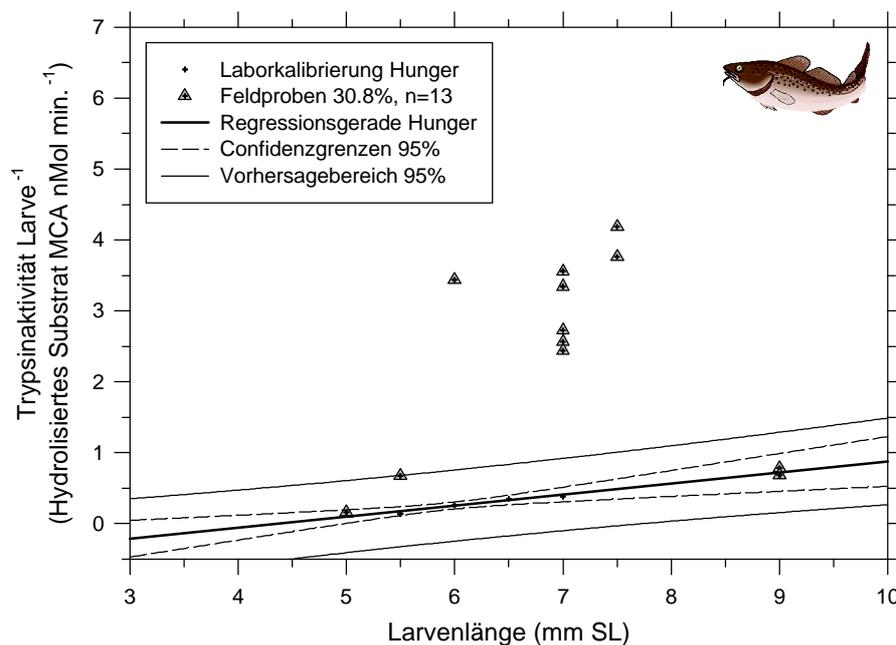


Abb. 88: Abschätzung des Anteils hungernder Dorschlarven in einer Feldprobe aus dem Bornholmbecken. Die Symbole repräsentieren individuelle Messwerte. Die Regressionsgerade mit dem 95%-Vorhersagebereich der Regression wurde aus den Werten für 2-8 Tage hungernde Dorschlarven im Laborversuch berechnet und dient als Kriterium für die Beurteilung des Ernährungszustandes der Feldlarven. Auf dieser Basis wurden in der Probe 30.8% der Dorschlarven als hungernd klassifiziert.

3.3.3 Sprotte (*Sprattus sprattus* L.)

Sprottenlarven wurden im Rahmen eines SARP⁶-Projektes (EU-Projekt MA 1.96, 1994) während einer gesamten Laichsaison in der Nordsee (Deutsche Bucht) gefangen. Ein Ziel dieser Studie war es, die abiotischen und biologischen Umgebungsvariablen während der Laichzeit von Mai bis August mit dem Ernährungszustand der jeweiligen Larvenkohorte zu vergleichen um die Anzahl überlebender juveniler Sprotten den Bedingungen zuordnen zu können, die während der larvalen Phase der Sprotten im Aufwuchsgebiet vorherrschend waren. Ein Auszug aus den Ergebnissen von dieser Studie wird in dieser Arbeit als Beispiel

⁶ SARP = **S**ardine and **A**nchovy **R**ecruitment **P**rogram

für eine praktische Anwendung der Konditionsanalysen an Fischlarven in der Feldforschung im grösseren Masstab gezeigt und diskutiert.

Die Abb. 89 zeigt die Konditionsanalysen für die Proben aus den verschiedenen Larvenkohorten von Mai bis August 1991. Da für Sprottenlarven noch keine Laborkalibrierung vorliegt, wurde als Beurteilungskriterium für den Ernährungszustand die Laborkalibrierung von Heringslarven verwendet, die als ebenfalls clupeiforme Art im physiologischen Verhalten den Sprotten ähnlich sind. Die an die Trypsinaktivitätswerte von 4-9 Tage hungernden Heringslarven aus der Laboraufzucht angepasste Regressionsgerade mit dem 95%-Vorhersagebereich der Regression wurde als Kriterium für die Beurteilung der Kondition der Sprottenlarven angewendet.

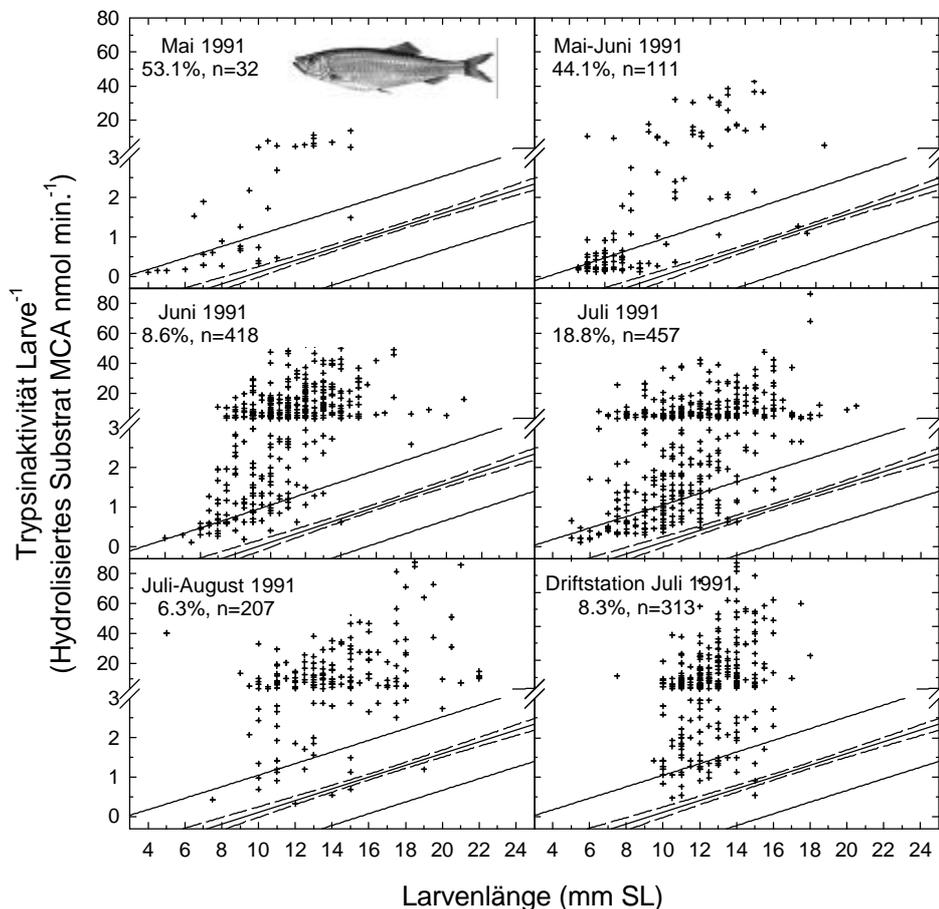


Abb. 89: Abschätzung der Anzahl hungernder Sprottenlarven in einer Feldstudie in der Nordsee von Mai bis August 1991. Jedes Symbol repräsentiert die Trypsinaktivität einer Sprottenlarve. Als Beurteilungskriterium für die Berechnung der Anzahl hungernder Sprottenlarven wurde die Laborkalibrierung von Heringslarven angewendet. Als Grenzwert gilt die obere Schranke des 95%-Vorhersagebereiches der Regressionsgeraden, die an die Trypsinaktivitäten von 4-9 Tage hungernden Heringslarven angepasst wurde. Zur besseren Auflösung des kritischen Bereichs wurde die Skalierung der Ordinate geteilt.

Auf dieser Basis wurden zwischen maximal 53.1% (Mai) und minimal 6.3% (Juli-August) Sprottenlarven als hungrig eingestuft. Für die Sprottenlarven, die während einer Kohortenverfolgung mittels eines Driftexperiments gesammelt wurden, liessen sich 8.3% als hungrige Larven bewerten. Die Gesamtzahl an individuell untersuchten Sprottenlarven spiegelt auch die Abundanz während der einzelnen Probennahmen wider. Die Durchschnittsgrösse der untersuchten Larven verschiebt sich in den Proben zum Ende der Laichzeit im August erwartungsgemäss zugunsten grösserer Larven, was die geringe Anzahl hungriger Sprottenlarven in diesen Proben erklären könnte.

Eine Zusammenstellung wichtiger Ergebnisse zur Beurteilung der gefundenen Konditionen der Sprottenlarven wird mit der Tab. 5 gezeigt.

Die Tabelle gibt im einzelnen Auskunft über die mittlere Länge aller analysierten Larven und die mittlere Trypsinaktivität in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme sowie die relative Anzahl der Stationen bei denen hungrige Larven festgestellt wurden. Sie gibt ferner eine Abschätzung der relativen Anzahlen an Larven zu verschiedenen Tageszeiten, bei denen bei der äusserlichen Begutachtung vor der biochemischen Analyse Futterorganismen im Darm erkannt wurden.

Monat/ Parameter	Mai	Mai-Juni	Juni	Juli	Juli-Aug.
Länge (mm SL) Mittel ± Std.	9.9 ± 3.0	8.8 ± 3.6	11 ± 2.7	11.6 ± 2.8	14.4 ± 3.0
Trypsinakt. Mittel ± Std. (nMol min. ⁻¹ Larve ⁻¹)	2.8 ± 3.4	10.5 ± 26.9	13.1 ± 26.9	13.1 ± 28.5	24.6 ± 34.1
Stationen mit hung. Larven %	100%	78.5%	32.1%	65.8%	15.6%
Rel. Hung. Larven %	53.1%	44.1%	8.6%	18.8%	6.3%
Mikrozooplanktondichte Ø Ind. Dichte ml ⁻¹	-	1.5	4.0	3.0	-
Juvenilendichte	O	O	+++	+	+++
Futter im Darm 6 - 18Uhr	2.9%	17.1%	21.7%	15.9%	14.9%
18- 6 Uhr	2.9%	5.0%	10.9%	7.5%	6.7%

Tab. 5: In der Tabelle sind wichtige zusätzliche Parameter zur Bewertung der Konditionsmessungen bei den Sprottenlarven (siehe Abb. 89) zusammengefasst. Alle Angaben beziehen sich ausschliesslich auf die biochemisch analysierten Sprottenlarven. Bei der Angabe der Juvenilendichte bedeutet O es wurden keine juvenilen Sprotten im Herbst gefangen, + bedeutet eine geringe Dichte, +++ bedeutet eine hohe Juvenilendichte.

Die Abb. 90 ist eine grafische Umsetzung eines Teils der Tab. 5 und zeigt den relativen Anteil hungernder Larven von der Gesamtzahl analysierter Larven. Daneben werden die Zooplanktondichten und eine grobe Grössenordnung der Anzahl juveniler Sprotten in den Herbstfängen angegeben.

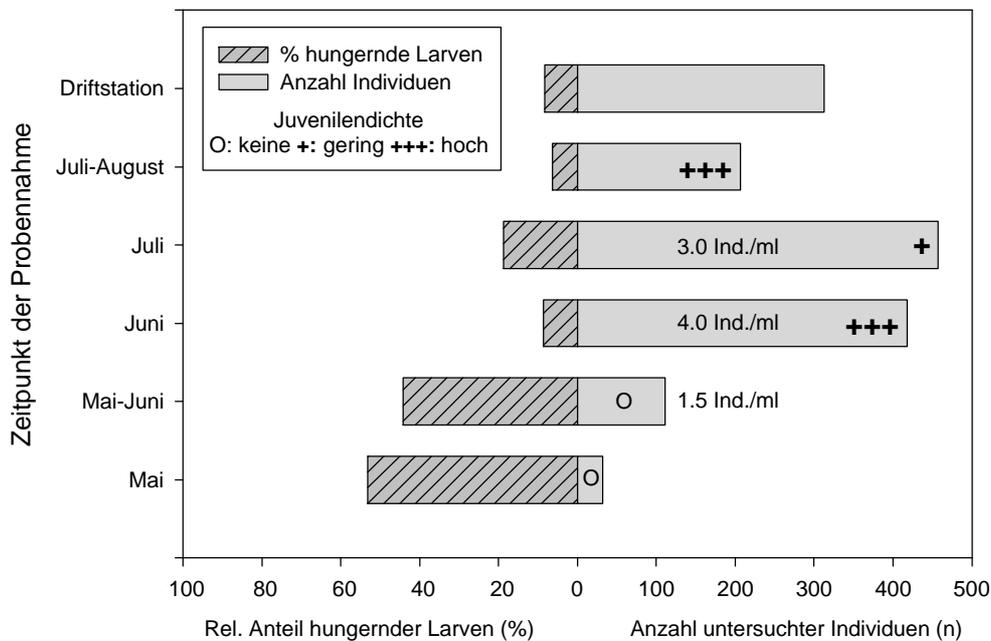


Abb. 90. Vergleich des relativen Anteils hungernder Sprottenlarven (linke Hälfte der Grafik) an der Anzahl biochemisch analysierter Individuen zu unterschiedlichen Probennahmeterminen während der gesamten Laichsaison der Sprotte in der Deutschen Bucht. Der Zeitpunkt der Probennahme ist an der Ordinate angegeben. Zusätzlich sind die Verhältnisse bei der Driftstation dargestellt. Die Angabe von Ind. ml⁻¹ bezieht sich auf die Zooplanktondichte. Bei der Angabe der Juvenilendichte bedeutet das Symbol O, dass keine juvenilen Sprotten im Herbst gefangen wurden, + bedeutet eine geringe Dichte, +++ bedeutet eine relativ hohe Dichte juveniler Sprotten in den Herbstfängen.

Im einzelnen wurden folgende Zusammenhänge zwischen der Larvenabundanz, der Mikrozooplanktondichte, dem Ernährungszustand der Sprottenlarven und der Anzahl juveniler Sprotten gefunden: zu Beginn der Laichzeit im Mai wurden nur wenige Larven gefangen, die meisten dieser Larven waren in der Übergangsphase von endogener zu exogener Nahrungsaufnahme und die Anzahl hungernder Larven war die höchste (53.1%) der gesamten Studie. Dies bestätigt das "critical periode" Konzept von Hjort (1914) welches besagt, dass Fischlarven in dieser Phase besonders anfällig gegen Verhungern sind. Ob dies in Zusammenhang mit zu geringen Mikrozooplanktondichten stand, konnte nicht beurteilt werden, da für diese Zeit keine Daten vorlagen. Im Mai/Juni wurde die zweithöchste Anzahl hungernder Sprottenlarven (44.1%) gefunden, mit Ausnahme der Stationen bei denen ein Planktonpatch festgestellt wurde mit 1.5 Indiv. ml⁻¹. Bei diesen Stationen wurden weniger als 10%

hungernde Sprottenlarven festgestellt. Im Juni wurde eine nur geringe Anzahl hungernder Sprottenlarven gefunden (8.6%) bei einer durchschnittlichen Zooplanktondichte von 4 Indiv. ml⁻¹ und einer eher homogenen Mikrozooplanktonverteilung über das gesamte Grid. Im folgenden Monat Juli wurde wieder eine höhere Zahl hungernder Sprottenlarven gefunden (18.8%) bei einer durchschnittlichen Mikrozooplanktonkonzentration von 3 Indiv. ml⁻¹. Im Vergleich zum Juni wurde eine geringere Anzahl von Sprottenlarven mit Futterpartikeln im Darmtrakt festgestellt, sowie eine deutlich höhere Zahl von Stationen, bei denen hungernde Larven gefunden wurden (vergl. Tab. 5). Bei den Sprottenlarven, die bei einer Driftstation während dieser Zeit gefangen und analysiert wurden, konnte dagegen nur ein geringer Anteil hungernde Larven festgestellt werden. Die Driftstation wurde in einem Gebiet mit hoher Larvendichte durchgeführt. Daten über die Zooplanktondichte an der Driftstation liegen jedoch nicht vor. Bei der letzten Probennahme im Juli/August wurde die geringste Anzahl hungernder Sprottenlarven festgestellt (6.3%). Hierbei handelt es sich im Vergleich zu den vorausgegangenen Proben vorwiegend um grössere Larven, die Larvendichte war wieder geringer. Daten über Zooplanktondichten liegen für diesen Zeitraum nicht vor.

Die Rückberechnung der Geburtsdaten der im Herbst (Dezember) des gleichen Jahres wie die Larven gefangenen juvenilen Sprotten zeigt eine hohe Anzahl juveniler Sprotten, die Anfang Juni und Ende Juni geschlüpft sind. Vom Juli ist eine relativ geringe Anzahl juveniler Sprotten hervorgegangen, eine weitere hohe Anzahl juveniler Sprotten stammt von Mitte August bis Anfang September. Anfang August waren die Sprottenlarven insgesamt in einem sehr gutem Ernährungszustand mit einem geringen Anteil hungernder Larven. Für die Zeit ab Mitte August liegen keine Daten mehr über den Ernährungszustand vor.

3.3.4 Brasilianische Sardine (*Sardinella brasiliensis* Steindachner 1879)

Die Laborkalibrierung der brasilianischen Sardine wurde auf eine Feldprobe angewendet. Die Abb. 91 zeigt die individuellen Messwerte für die Sardinenlarven aus der Feldprobe und die Regressionsgerade, welche aus den Trypsinaktivitäten von 1-2 Tage hungernden Sardinenlarven aus der Laborkalibrierung errechnet wurde. Die obere Schranke des 95%-Vorhersagebereich der Regression bildete das Kriterium für die Berechnung der Anzahl hungernder Sardinenlarven in der Feldprobe. Unter Anwendung der Laborkalibrierung wurden 28.6% der Sardinenlarven als hungernd eingestuft.

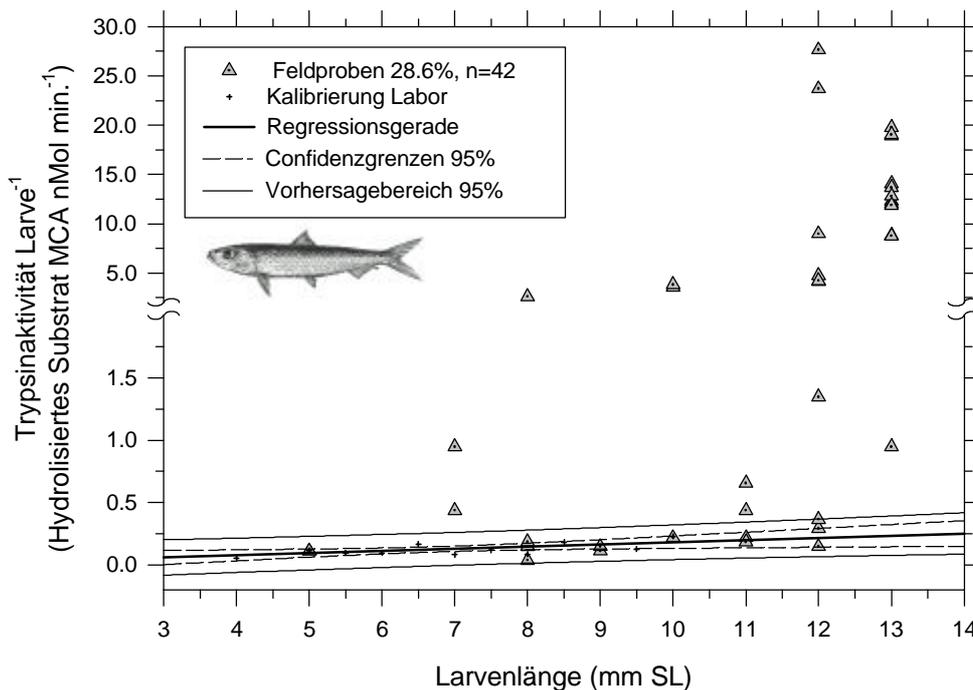


Abb. 91: Abschätzung der Anzahl hungernder Sardinenlarven in einer Feldprobe auf der Basis der Laborkalibrierung. Jedes Dreiecksymbol repräsentiert die Trypsinaktivität einer Sardinenlarve. Als Beurteilungskriterium für die Berechnung der Anzahl hungernder Sardinenlarven wurde die Laborkalibrierung für diese Art angewendet. Als Grenzwert gilt die obere Schranke des 95%-Vertrauensbereich der Regressionsgeraden, die an die Trypsinaktivitäten von 1-2 Tage hungernden Sardinenlarven angepasst wurde. Hierbei wurden 28.6% der Larven aus der Feldprobe als hungernd eingestuft.

3.3.5 Schellfisch (*Melanogrammus aeglefinus* L.)

Die Schellfischlarven stammen aus einer Feldstudie deren Hintergrund unter Punkt 2.3.6 näher beschrieben wurde. Die Ergebnisse der Konditionsmessungen an diesen Larven sollten demonstrieren, wie die Abschätzung des Anteils hungernder Larven in Feldproben bei einer nicht kalibrierten Art wie z.B. dem Schellfisch, durch die Anwendung der Laborkalibrierung von einer sich physiologisch ähnlich verhaltenenen Art möglich ist. Dieses Beispiel soll eine Alternative zur Anwendung des in dieser Arbeit vorgeschlagenen generellen Faktors aufzeigen.

Die Trypsinaktivitäten der Schellfischlarven aus der Feldprobe entsprechen etwa dem Muster der Trypsinaktivität von im Labor aufgezogenen Wolfsbarschlarven (Abb. 92). Dies trifft auch auf die Größenordnungen bei der Trypsinaktivität zu. Unter diesen Voraussetzungen wurde eine Abschätzung des Anteils hungernder Schellfischlarven in der Feldprobe unter Anwendung der Laborkalibrierung für hungernde Wolfsbarschlarven vorgenommen. Auf dieser Basis wurden 8.9% der Schellfischlarven aus der Feldprobe als hungernde Larven eingestuft.

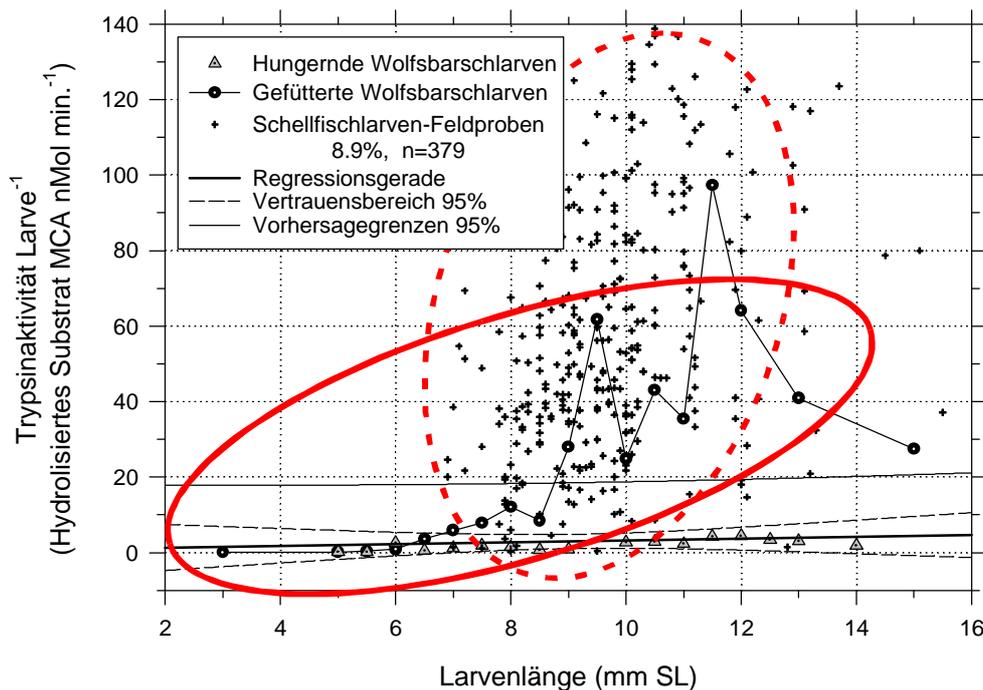


Abb. 92: Abschätzung des Anteils hungernder Schellfischlarven in einer Feldprobe unter Berücksichtigung der Laborkalibrierungen für Wolfsbarschlarven. Jedes Kreuzsymbol steht für die Trypsinaktivität einer Schellfischlarve. Die Punkte repräsentieren die Mittelwerte für gefütterte Wolfsbarschlarven aus der Laboraufzucht. Die Ellipsen markieren den Bereich, in dem 95% der individuellen Messwerte für gefütterte Wolfsbarschlarven respektive für Schellfischlarven (gestrichelt) zu finden sind. Die Regressionsgerade mit dem 95%-Vorhersagebereich der Regression für 2-7 Tage hungernde Wolfsbarschlarven dient als Kriterium für die Beurteilung des Ernährungszustandes der Schellfischlarven.

3.3.6 Tagesrhythmik der Trypsinaktivität in Feldproben

Die folgenden Ergebnisse zeigen Beispiele für die tageszeitlichen Schwankungen der Trypsinaktivität für die unter natürlichen Bedingungen aufgewachsenen Fischlarven von Sprotte und Sardine. Die Proben für diese Untersuchungen wurden jeweils durch die Verfolgung einer Fischlarvenkohorte unter Verwendung eines Driftkörpers entnommen und stehen im Zusammenhang mit einer SARP-Studie von der unter 3.3.3. bereits Ergebnisse präsentiert wurden.

3.3.6.1 Sprotte (*Sprattus sprattus* L.)

Für Sprottenlarven können die Ergebnisse von 2 Driftstationen, bei denen Proben mit einem zeitlichen Abstand von etwa 8 Wochen entnommen wurden, gezeigt werden. In der Abb. 93 sind die Ergebnisse für eine Driftstation, die über einen Zeitraum von 24 Stunden beprobt wurde, dargestellt. Die Trypsinaktivität zeigt einen ausgeprägten Tagesrhythmus mit ansteigender Tendenz in den Proben die morgens um 8 und 10 Uhr genommen wurden. Ein Maximum wurde um 10 Uhr beobachtet. Danach fällt die Aktivität in mehreren Stufen bis zum Abend auf den tiefsten Wert um etwa 20 Uhr. Erst um etwa 4 Uhr morgens am nächsten Tag steigt die Aktivität wieder an und erreicht erneut einen hohen Wert um 6 Uhr.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den unterschiedlichen mittleren Larvenlängen wurde nicht gefunden. Ein Einfluss der geringfügigen Längenunterschiede auf die periodischen Schwankungen der Trypsinaktivität ist nicht erkennbar. Alle während der Driftstation gefangenen Sprottenlarven wurden in diese Darstellung einbezogen. Die gleichmäßige Längenverteilung weist darauf hin, dass die Larven aus einer Kohorte stammen. Eine Abschätzung zum Ernährungszustand wurde bei diesen Proben nicht durchgeführt. Die Mittelwerte der niedrigsten Trypsinaktivitäten liegen aber noch deutlich oberhalb der Werte von hungrigen Heringslarven entsprechender Länge (vergl. 3.2.1.1).

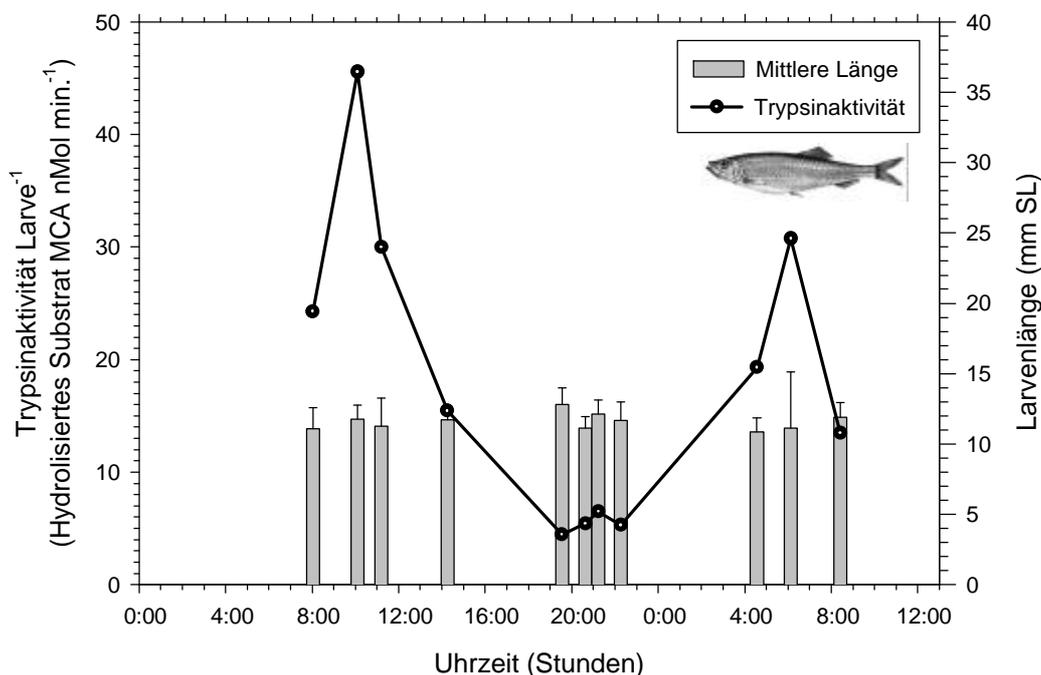


Abb. 93: Tageszeitlicher Rhythmus der Trypsinaktivitäten bei Sprottenlarven von einer Driftstation in der Deutschen Bucht über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-15 individuellen Messungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den Standardabweichungen.

Bei der zweiten Driftstation wurde eine Larvenkohorte über einen Zeitraum von 36 Stunden mit hoher zeitlicher Dichte beprobt. Die Abb. 94 zeigt die Ergebnisse für die Trypsinaktivitätsmessungen in diesen Proben. In den ersten Proben aus der Nacht zwischen 1 Uhr und 5 Uhr wurden die maximalen Trypsinaktivitäten während des gesamten Driftexperiments gemessen. Danach folgt ein Rückgang der Aktivitäten. Um etwa 8 Uhr morgens ist ein Tiefpunkt erreicht, gefolgt von einem erneuten Anstieg, der um 12 Uhr mittags ein weiteres Mal einen sehr hohen Wert erreicht. Zwischen 16 Uhr und Mitternacht wurden im Vergleich dazu geringere Trypsinaktivitäten gefunden, danach folgt ein erneuter Anstieg, weitere hohe Werte wurden um etwa 2 Uhr und von 5 bis 8 Uhr morgens gefunden.

Auch bei dieser Driftstation wurden alle analysierten Larven bei der Darstellung der Ergebnisse berücksichtigt. Ein signifikanter Einfluss der Larvengröße auf die tageszeitlichen Schwankungen bei der Trypsinaktivität kann ausgeschlossen werden. Die gleichmässige Längenverteilung ist auch hier ein Hinweis auf die Zugehörigkeit aller Larvenproben zu einer Kohorte. Die Bestimmung des Anteils hungernder Larven bei den Proben von der Driftstation ergab 8.3%. Dagegen wurde bei der Gesamtbilanz aller zur selben Zeit auf einem Stationsgrid in demselben Gebiet gefangenen Sprottenlarven ein Anteil von 18.8% hungernden Sprottenlarven festgestellt (vergl. Abb. 89).

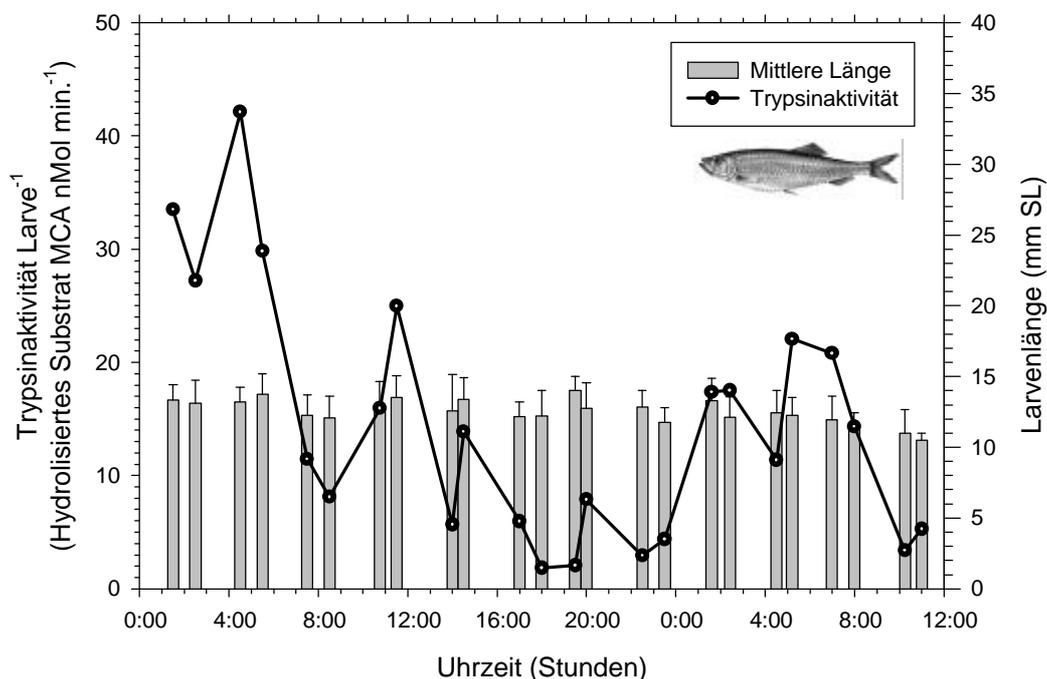


Abb. 94: Tageszeitlicher Rhythmus der Trypsinaktivitäten bei Sprottenlarven von einer Driftstation in der Deutschen Bucht über den Zeitraum von 36 Stunden. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-18 individuellen Messungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den Standardabweichungen.

Im Vergleich mit der ersten Driftstation zeigt sich ein sehr ähnliches Verhalten. Zusammenfassend kann folgendes Muster für die Trypsinaktivität bei Sprottenlarven in Beziehung zur Tageszeit skizziert werden: die Trypsinaktivität erreicht nach Mitternacht bis zum frühen Morgen Maximalwerte, nachmittags bis Mitternacht wurden niedrige Trypsinaktivitäten festgestellt.

3.3.6.2 Sardine (*Sardina pilchardus* Walbaum 1792)

Im Zusammenhang mit dem schon erwähnten SARP-Projekt wurden Sardinienlarven vor der spanischen Nordwestküste gefangen. Dabei wurde bei einer Driftstation eine Larvenkohorte über einen Zeitraum von etwa 48 Stunden verfolgt und regelmässig beprobt.

Die Abb. 95 zeigt die Ergebnisse der tagesperiodischen Schwankungen für die Trypsinaktivitäten mit einem ausgeprägten, sich wiederholenden Muster während der 48 Stunden. Die Trypsinaktivität steigt vom späten Abend bis zum frühen Morgen schnell an, etwa um 7 Uhr wird ein Maximum erreicht. Danach nimmt die Trypsinaktivität wieder gleichmässig ab und erreicht am frühem Abend um etwa 17 Uhr einen Tiefstwert. Danach steigt die Aktivität wieder an und erreicht wiederum sehr hohe Werte ab etwa 3 Uhr bis 8 Uhr morgens. Da die Füllung der Schwimmblase bei Fischlarven möglicherweise in Beziehung zum tagesperiodischen Zyklus von Nahrungsaufnahme und Verdauungsphase gehört, wurden bei der Analyse der Sardinienlarven die Anzahl von Larven mit gefüllter Schwimmblase festgehalten. Eine gefüllte Schwimmblase wurde nur bei den Proben zwischen Mitternacht und 4 Uhr morgens beobachtet.

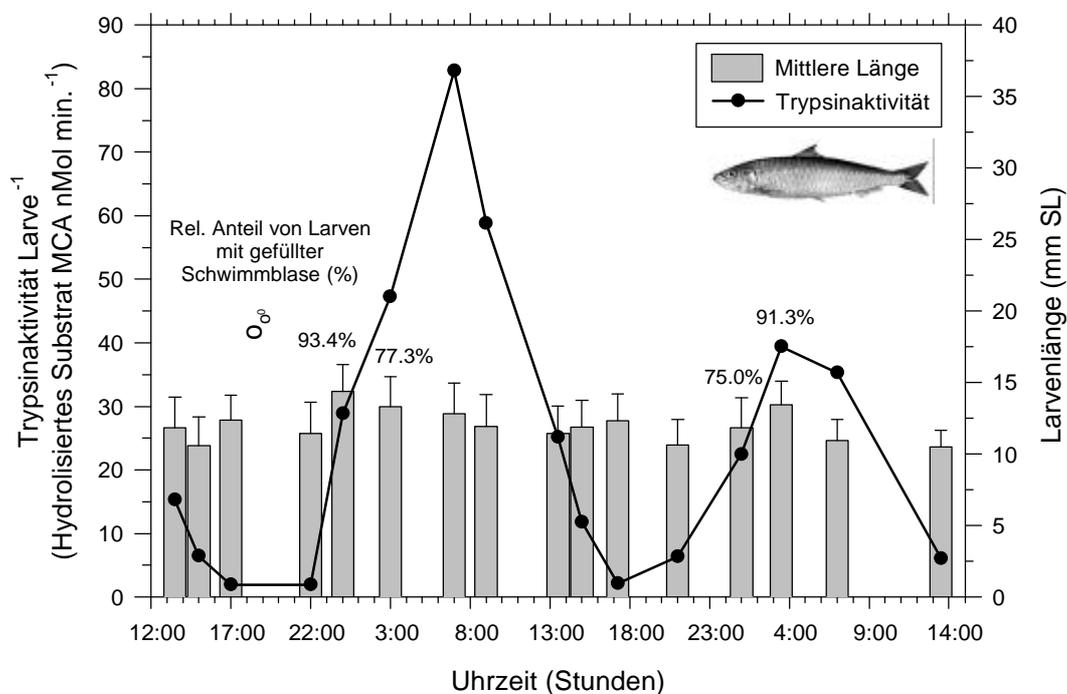


Abb. 95: Tagesperiodischer Rhythmus der Trypsinaktivitäten bei Sardinienlarven von einer Driftstation vor der spanischen Nordwestküste über den Zeitraum von 48 Stunden. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 8-20 individuellen Messungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den Standardabweichungen. Der relative Anteil von Sardinienlarven mit gefüllter Schwimmblase ist bei den entsprechenden Proben vermerkt.

Für die Berechnung der in der Grafik dargestellten Trypsinaktivitäten wurde nur ein bestimmtes Grössenspektrum aus den jeweiligen Proben ausgewählt. So konnte vermieden werden, dass die Analyse der tagesperiodischen Änderungen der Trypsinaktivität bei den Sardinienlarven durch signifikante Unterschiede bei der Larvengrösse verfälscht wurde.

Zur Abschätzung des Ernährungszustandes aller analysierten Sardinenlarven von der Driftstation wurde zum einen die Laborkalibrierung von Heringslarven angewendet, zum anderen wurde zum Vergleich eine Abschätzung über die Laborkalibrierung von der brasilianischen Sardine durchgeführt. Die obere Grenze des 95%-Vorhersagebereichs der Regression für die jeweils hungernden Larven der beiden Arten wurde als Grenzwert angenommen. Mit diesem Kriterium wurde auf der Basis der hungernden Heringslarven insgesamt ein Anteil von 10.5% hungernden Sardinenlarven errechnet, auf der Basis hungernder brasilianischer Sardinenlarven wurden 3.5% hungernde Larven ermittelt. Für alle im Rahmen dieser Kampagne durchgeführten Probennahmen (insgesamt 4 Probennahmeterminale von April bis Juni) wurde in der Gesamtbilanz aller untersuchten Sardinenlarven ein Anteil von 21.7% bis zu 38.8% hungernder Larven festgestellt. Der höchste Anteil (38.8%) wurde für die Sardinenlarven gefunden, die bei der Beprobung eines Stationsnetzes gefangen wurden, das im zeitlichen Zusammenhang mit der Driftstation abgefahren wurde.

4 Diskussion

Abgeleitet von den Erkenntnissen früherer Studien (z.B. Dabrowski 1982, Hjelmeland 1984, Ueberschär 1985, Pedersen et al. 1987), wurde die Eignung der Trypsinaktivität als Indikator zur Bestimmung des Ernährungszustandes sowie der Fressaktivität von Fischlarven geprüft. Wie gezeigt wurde, ist die Trypsinaktivität durch den Mechanismus der an die Nahrungsaufnahme gekoppelten Produktion und Sezernierung des Verdauungsenzyms Trypsin ein sehr schnell auf die Veränderungen der Nahrungsaufnahme reagierender Indikator. Damit ist die Messung der Trypsinaktivität eine ideale Ergänzung beispielsweise zu der biochemischen Bestimmung der Nukleinsäuren, da das RNA/DNA-Verhältnis ein auf Veränderungen des Ernährungszustandes eher langsam reagierender Indikator ist (Ferron & Leggett 1994, Clemmesen 1995). Die Trypsinaktivität erfasst Veränderungen des Ernährungszustandes im Bereich von Stunden bis Tagen, während das RNA/DNA Verhältnis Veränderungen im Ernährungszustand erst nach mehreren Tagen anzeigt. Die alleinige Anwendung eines träge reagierenden Indikators kann zu einer Fehleinschätzung des Ernährungszustandes innerhalb einer Larvenkohorte führen. Bevor Hungerzustände mit träge reagierenden Indikatoren gemessen werden können, sind die betroffenen Larven möglicherweise bereits Räubern zum Opfer gefallen (Booman et al. 1991, Rice et al. 1987) oder geben die für Fischlarven normalerweise typischen Vertikalwanderungen auf und sind so nicht mehr mit den gut ernährten oder erst kurzzeitig hungernden Larven in demselben Wasserkörper zu finden (Rosenthal & Alderdice 1976).

Um die Eigenschaften der Trypsinaktivität als Indikator genauer zu prüfen, wurden Fischlarven von 6 Arten im Labor unter verschiedenen kontrollierten Bedingungen aufgezogen und die Trypsinaktivität bestimmt. Diese Arbeit ist die erste Studie, die die Eignung der Trypsinaktivität zur Darstellung der Fressaktivität und zur Beurteilung des Ernährungszustandes von Fischlarven in Felduntersuchungen detailliert untersucht. Eine wichtige Forderung für die Bestimmung des Ernährungszustandes ist eine genügend hohe Empfindlichkeit der Messmethodik, um Fischlarven individuell beurteilen zu können. Bei der Anwendung in Feldstudien ist dies eine Voraussetzung, um Aussagen über die Bedeutung von Verhuntern für zukünftig zu erwartende Jahrgangsstärken treffen zu können. Da zum Beginn dieser Studie eine derart empfindliche Methode zur Messung der Trypsinaktivität nicht zur Verfügung stand, stellt die Entwicklung einer hochempfindlichen biochemischen Analytik zur Bestimmung der Trypsinaktivität einen wesentlichen Teil dieser Arbeit dar.

Im ersten Teil der Diskussion werden die verschiedenen methodischen Aspekte des analytischen Verfahrens diskutiert. Im zweiten Teil werden die Versuche zur Fischlarvenaufzucht und die Ergebnisse zu den Trypsinaktivitätsmessungen aus den verschiedenen Kalibrierungsversuchen erörtert. Der letzte Teil beschäftigt sich mit der Anwendung der Trypsinaktivitätsmessung bei Fischlarven aus verschiedenen Felduntersuchungen zur Abschätzung des Ernährungszustandes.

4.1 Biochemische Analytik und methodische Aspekte

Sensitivität des Enzymassays

Die Bestimmung von Enzymaktivitäten erfolgt in der Regel mit Hilfe chromogener Methoden. In der entsprechenden Literatur (z.B. Bergmann 1983) fanden sich keine Hinweise auf Methoden zur Bestimmung der Trypsinaktivität, die die Forderung nach einer Empfindlichkeit zur individuellen Analyse in Fischlarven erfüllten. Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit waren einige fluorogene Substrate im kommerziellen Handel erhältlich, darunter das CBZ-L-Arg-MCA, das zeitgleich von Zimmermann et al. (1977) und Kanaoka et al. (1977) erstmalig synthetisiert und als spezifisch für Trypsin und Papain beschrieben wurde. Die Nachweisgrenze für ein gereinigtes Standardtrypsin wurde mit 5ng ml^{-1} angegeben. Das entspricht einer etwa 100fach höheren Empfindlichkeit verglichen mit chromogenen Substraten (z.B. $\text{N}\alpha$ -Benzoyl-L-Arginin-4-Nitroanilide-hydrochlorid, L-BAPNA) wie sie in früheren Messungen zur Trypsinaktivität bei Fischlarven eingesetzt worden waren (Ueberschär 1985). Damit war analytisch eine ausreichende Empfindlichkeit erreicht, um die Trypsinaktivität in Fischlarven auch der jüngsten Stadien individuell bestimmen zu können.

Da im Zusammenhang mit diesem Substrat aber keine Untersuchungen zur Trypsinaktivitätsbestimmung an biologischem Material vorlagen, mussten umfangreiche eigene Experimente durchgeführt werden, um die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Trypsinaktivitätsbestimmung an Fischlarven zu prüfen. Die unter optimierten Bedingungen erreichte Empfindlichkeit mit einem Standardtrypsin lag bei 0.5ng ml^{-1} und war damit etwa 500fach höher als bei Methoden mit chromogenen Substraten. Linearität und Proportionalität waren sowohl für Standardtrypsin als auch für Trypsin aus Fischlarven über einen weiten Konzentrationsbereich gewährleistet und für den relevanten Bereich der praktischen Messungen an Fischlarven gut reproduzierbar.

Quantifizierung der Trypsinaktivität

Enzymaktivitätsmessungen aus unterschiedlichen Experimenten, deren Ergebnisse in der Literatur beschrieben werden, sind oft nicht direkt vergleichbar, weil unterschiedliche Bezugsgrößen zur Quantifizierung verwendet werden. In dieser Arbeit wurde deshalb ein Verfahren gewählt, bei dem die Trypsinaktivitäten auf die freigesetzte Menge des Fluorophors (4-methylcoumarinyl-7-amid, MCA) pro Zeiteinheit bezogen werden. Wird dieses Verfahren bei Enzymaktivitätsmessungen wie z.B. von Trypsin und Chymotrypsin eingesetzt und ein fluorogenes Substrat mit dem Fluorophor MCA als fluoreszierende Gruppe verwendet, so sind die Ergebnisse, unabhängig von der jeweiligen Geräteausstattung, direkt vergleichbar.

Inhibitoren und Autoaktivierung

Bei der Messung von Enzymaktivitäten in Zellhomogenaten besteht die Möglichkeit, dass sich im lebenden Organismus natürlicherweise voneinander getrennte Zellbestandteile mit-

einander vermischen und bei der Analyse unerwünschte Reaktionen zur Folge haben. Hjelmeland (1983) beschreibt Proteinase Inhibitoren im Muskel und Serum von Dorschen. Wenn solche Inhibitoren im Larvenhomogenat in wechselnden Konzentrationen vorkommen und die Trypsinaktivität hemmen, wären nicht quantifizierbare Aktivitätsverluste die Folge. Hofer (pers. Mitteilung) fand Hinweise, dass in Homogenaten von Coregonenlarven (*Coregonus sp.*) Trypsininhibitoren eine quantitative Messung der Trypsinaktivitäten verhindern können. Erst eine Fällung mit Äthanol zur Trennung von Trypsin und Inhibitor ermöglichte eine exakte Messung der Aktivitäten (Hofer & Koeck 1989). Auch ein gegenteiliger Effekt kann die Trypsinaktivitätsmessungen verfälschen. Wenn relativ grosse Mengen der Trypsinvorstufe Trypsinogen im Homogenat frei vorliegen, kann dieses Trypsinogen durch Autoaktivierung in aktives Trypsin umgewandelt werden (Hjelmeland 1995) und zu einer Überschätzung der Trypsinaktivität in *in vivo* führen. In dieser Arbeit wurden deshalb einige sogenannte "Spike-Versuche" durchgeführt (siehe 2.1.6), um exemplarisch die Homogenate von Herings- und Steinbuttlarven als typische Vertreter von Fischlarven mariner Arten auf die Präsenz von Inhibitoren zu testen. In den Homogenaten von Steinbuttlarven und bei grossen Heringslarven aus Feldproben (Schlei) wurden keine Aktivitätsverluste bzw. Aktivitätsgewinne gefunden. Bei kleineren Heringslarven aus der Laboraufzucht wurden geringe Aktivitätsverluste festgestellt, deren Grössenordnung aber die Reproduzierbarkeit des verwendeten Aktivitätsassays nicht in Frage stellt. Die regulatorischen Fähigkeiten zur Steuerung der Enzymaktivität über spezifische Inhibitoren nimmt mit der Larvengrösse und dem Alter zu. Folglich sind eher bei grösseren Fischlarven Inhibitoren im Homogenat zu erwarten, das war bei den hier durchgeführten "Spike-Versuchen" nicht der Fall. Damit haben sich keine eindeutigen Hinweise auf das Vorliegen von störender Inhibition oder Autoaktivierung ergeben.

Weiterhin wurde geprüft, ob während der Standzeiten der Homogenate, die von der Zentrifugation bis zur Messung der letzten Probe mehrere Stunden betragen konnte, mit einer Autoaktivierung von Trypsinogen zu rechnen ist. Dabei wurden nur geringe Aktivitätsänderungen festgestellt, die Unterschiede lagen in dem Bereich der Präzision der Messmethode (etwa $\pm 5\%$). Dies wurde durch ständige Eiskühlung der Homogenate während der Behandlung und Standzeiten erreicht. Bei etwa 0°C sind *in vitro* keine nennenswerten Enzymaktivitäten mehr zu erwarten (Bergmeyer 1983) und eine Autoaktivierung von Trypsinogen ist so weitestgehend ausgeschlossen.

Reinigungsschritte

Zur Reinigung der aus den Fischlarven hergestellten Ganzkörperhomogenate wurden diese vor der Aktivitätsmessung zentrifugiert. Dazu waren die geeigneten Zentrifugationsbedingungen für eine maximale Aktivitätsausbeute herauszufinden. Es wurde geprüft, ob höhere g-Beschleunigungen die Aktivitätsausbeute durch den Verlust von Trypsinmolekülen, die durch Bindung an Zelltrümmer dem Überstand entzogen werden, verringern können (Pelletier et al. 1994). Dies war nicht der Fall, was gleichzeitig bedeutet, dass die Prozedur zur

Homogenisierung der Fischlarven ausreichend war, um alle Trypsinmoleküle von den Zellbestandteilen zu trennen und vollständig in Lösung zu bringen. Die Möglichkeit, die Trypsinaktivitätsmessung ohne weitere aufwendige Reinigungsschritte nach der Zentrifugation durchzuführen, verringert die Fehlerquellen und Verluste erheblich. Dies ist vor dem Hintergrund der hohen Sensitivität der fluoreszenzphotometrischen Technik für die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Messungen von grosser Bedeutung.

Enzymkinetik

Die enzymkinetischen Parameter wie die halbmaximale Substratsättigung (K_m) und die katalytische Effizienz (K_{cat}/K_m) wurden ermittelt: um über die Berechnung der K_m -Werte zu prüfen, ob die empirisch bestimmte Substratkonzentration für eine maximale Geschwindigkeit bei der Substrathydrolyse ausreichend war. Die empirisch gefundene Substratkonzentration wurde bei diesem Vergleich als optimal für alle untersuchten Trypsine (Standardtrypsin und Trypsin aus Fischlarven) bestätigt. Unvermeidbare Ungenauigkeiten bei der Einwaage und bei der Herstellung des Substrates konnten die maximal erreichbare Geschwindigkeit der Substrathydrolyse daher nicht beeinflussen.

Die Bestimmung der katalytischen Effizienz (K_{cat}/K_m) ist die geeignete Methode, um mögliche Unterschiede in der Affinität der verschiedenen Trypsine zu dem Substrat CBZ-L-Arg-MCA aufzuzeigen. Nur bei ähnlicher katalytischer Effizienz lassen sich die gemessenen Trypsinaktivitäten von den Larven verschiedener Arten direkt quantitativ miteinander vergleichen. Bei den Larven der beiden geprüften Arten (Hering und Steinbutt) liegen diese Werte in derselben Grössenordnung. Daraus wurde geschlossen, dass sich auch die Trypsine aus den Fischlarven der übrigen in dieser Arbeit untersuchten Arten nicht wesentlich in ihren enzymkinetischen Eigenschaften von denen unterscheiden, die für die Herings- und Steinbuttlarven bestimmt wurden. Unter diesen Voraussetzungen ist der quantitative Vergleich und die Bewertung der Unterschiede bei den Trypsinaktivitäten für die verschiedenen Arten sinnvoll.

Temperatur und pH-Optimum

Die Annahme, dass die Aktivität der Enzyme eines Organismus unter *in vitro* Bedingungen bereits maximale Aktivität bei der *in vivo* im arttypischen Lebensraum vorherrschenden Temperatur zeigen müsste, trifft in der Regel für Fischlarven nicht zu. Die Trypsinaktivität ist bei den untersuchten Fischlarven bis zur beginnenden Denaturierung der Enzymproteine positiv mit der Temperatur korreliert. Dieser Effekt ist alleine mit der RGT-Regel erklärbar und wird unter *in vitro* Bedingungen aus praktischen Gründen bei der Messung genutzt, um in kurzer Zeit einen hohen Substratumsatz zu erzielen. In diesem Zusammenhang ist aber zu berücksichtigen, dass Trypsine aus poikilothermen Tieren wie Fischen weniger stabil gegen höhere Temperaturen sind als beispielsweise das Trypsin aus Rinderpankreas (Åsgeirsson et al. 1989, Bjarnason et al. 1993, Hjelmeland 1995). Diese Einschränkung

wurde bei den Experimenten zum optimalen Temperaturbereich der Aktivitätsmessungen bestätigt und bei der Wahl der optimalen Messtemperatur berücksichtigt.

Ein weiteres Kriterium für die Auswahl der Temperatur bei einer Enzymaktivitätsmessung mit einem fluoreszierenden Substrat ist in den physikalischen Eigenschaft der Fluoreszenz begründet. Die Fluoreszenzintensität nimmt mit zunehmender Temperatur infolge der Deaktivierung der Moleküle im angeregten Zustand ab (Guilbault 1973). Eine weitere, bei der Temperaturwahl zu berücksichtigender substratspezifischer Faktor ist die temperaturabhängige, nicht-enzymatische Hydrolyse. Diese spontane Hydrolyse kann störend sein, wenn sie etwa in der gleichen Größenordnung liegt wie die Trypsinaktivität einer Probe. Bei dem Substrat CBZ-L-Arg-MCA beginnt dieser kritische Bereich bei etwa 30°C. Unter der Berücksichtigung aller einflussnehmenden Parameter auf die fluoreszenzphotometrische Analytik zur Bestimmung der Trypsinaktivität wurde deshalb eine Solltemperatur von 30°C als ein guter Kompromiss zwischen der Anpassungszeit der Probe in der Küvette, der Effizienz der Substrathydrolyse und der Quantenausbeute gefunden. Zugleich liegt diese Temperatur deutlich unterhalb der Schwelle (etwa 38°C), bei der beginnende Denaturierungserscheinungen für Fischlarventrypsine bei den entsprechenden Untersuchungen zu dieser Arbeit zu beobachten waren.

Die meisten Enzyme können ihre maximale spezifische Wirkung nur innerhalb eines bestimmten pH-Bereiches entfalten. Nur bei dem für das jeweilige Enzym optimalen pH-Wert sind ein maximaler Effekt und eine reproduzierbare Enzymkatalyse zu erreichen. Die Aktivitätskurve in Abhängigkeit vom pH-Wert hat meistens die Form einer Glockenkurve mit sehr steilen Flanken, wobei der optimale pH-Bereich, insbesondere beim Trypsin, nur sehr schmal ist. Für Trypsin wird in der Literatur ein pH-Bereich von 7-9 als optimal angegeben (Karlson 1984, Löffler et al. 1985). Da sich im Einzelfall die Trypsine je nach Herkunft in ihrem pH-Optimum unterscheiden können, wurde der optimale pH-Bereich für die Trypsine aus den Fischlarven bestimmt. Für die Fischlarventrypsine wurde das Optimum bei pH 8.0 festgestellt. Dieser Wert deckt sich mit dem pH-Optimum das beispielsweise Hjelmeland & Raa (1982) für Trypsin aus der Lodde (*Mallotus villosus*) oder Murakami & Noda (1981) für Trypsin aus der japanischen Sardine (*Sardinops melanostica*) bestimmt haben.

Wie bei der Temperatur ist auch beim pH-Wert eine substratspezifische Komponente zu berücksichtigen. Die spontane Hydrolyse des verwendeten Substrats CBZ-L-Arg-MCA liegt bei einem deutlich über 8 betragenden pH-Wert in derselben Größenordnung wie die Trypsinaktivitätswerte kleiner Fischlarven. Der pH-Wert 8 entspricht dem für die Fischlarvenenzyme optimalen pH-Wert und wurde deshalb bei der Messung nicht überschritten.

Interkalibrierung

Lochmann et al. (1996) stellten in einer Studie zur Bestimmung des Ernährungszustandes von Fischlarven mit biochemischen Methoden fest, dass bei 75% der entsprechenden Studien der Einfluss von Nahrungsorganismen im Darmtrakt der Fischlarven die Messungen

verfälscht haben kann. In diesem Zusammenhang wird deshalb oft vermutet, dass die Enzyme aus den Nährtieren, welche in den Verdauungstrakt der Fischlarven gelangt sind, die Trypsinaktivitätsmessung stark beeinflussen (vergl. Ferron & Leggett 1984 und dort zitierte Literatur). Basierend auf einer Studie, bei der ein RIA zur Bestimmung ausschliesslich der larveneigenen Trypsine mit der hier verwendeten Trypsinaktivitätsbestimmung verglichen wurde (Ueberschär et al. 1992), konnte diese Vermutung für die in dieser Studie durchgeführten Analysen überprüft werden. Es wurde festgestellt, dass die Trypsinaktivität und -quantität im Darmtrakt sowohl bei gefütterten als auch bei hungernden Heringslarven signifikant miteinander korreliert sind. Dies zeigt, dass die mit dem Aktivitätsassay gemessenen Trypsinaktivitäten im wesentlichen endogenen Ursprungs sind. Unterschiede in der Korrelation im Bereich geringster Trypsinquantitäten können auf die etwas höhere Empfindlichkeit (Faktor 3 bis 4) des RIA zurückgeführt werden.

In einem weiteren Versuch mit Heringslarven, bei dem die Trypsinsezernierung in Reaktion auf die Anzahl aufgenommener Copepodennauplien geprüft wurde, konnten die Ergebnisse durch die Umrechnung der Trypsinaktivitäten in Quantitäten direkt miteinander verglichen werden. Mit beiden Methoden (RIA und Aktivitätsassay) wurde unabhängig voneinander gezeigt, dass der Trypsingehalt im Darmtrakt mit zunehmender Nauplienanzahl linear ansteigt. Die an die Werte der beiden Methoden jeweils angepassten Geraden verlaufen dabei parallel zueinander. Beide Ergebnisse erlauben den Rückschluss, dass ein signifikanter Einfluss von exogenem Trypsin bei der Aktivitätsmessung nicht gegeben ist.

Oozeki & Bailey (1995) untersuchten die Entwicklung der Trypsinaktivität bei den Larven vom Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) mit der in dieser Arbeit vorgestellten Analytik. Dabei berechneten sie den Anteil exogenen Trypsins aus Rotatorien (*Brachionus plicatilis*) mit 0.9 bis 5.9% bei den Aktivitätsmessungen an den 7 bis 39 Tagen alten Larven. Dieser Trypsinanteil konnte auf durchschnittlich 2.3 (7 Tage alte Larven) bis 84.6 (39 Tage alte Larven) Rotatorien im Darmtrakt der Larven zurückgeführt werden. Auch Cahu et al. (1995) fand bei Experimenten an Wolfsbarschlarven, dass der Anteil exogenen Trypsins weniger als 5% der gesamten gemessenen Trypsinaktivität ausmachte. Dieser relativ geringe Anteil exogenen Trypsins an der Gesamtaktivität deckt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit, steht aber im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (Dabrowski 1982, Lauff & Hofer 1984, Ueberschär 1985, Munilla-Moran et al. 1990). Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte methodisch begründet sein. Die fluoreszenzphotometrische Analytik mit dem Substrat CBZ-L-Arg-MCA ist spezifischer für Trypsin als das in den meisten Untersuchungen verwendete chromogene Substrat L-BAPNA. Möglicherweise unterscheiden sich auch die in den Futterorganismen vorkommenden trypsinähnlichen Proteasen in ihrer Affinität zu den unterschiedlichen Substraten. Kanaoka et al. (1977) fand für Trypsin aus Rinderpankreas einen 3fach höheren K_m -Wert für ein chromogene Substrat verglichen mit dem hier verwendeten fluorogenen Substrat, was einer deutlich geringeren Affinität des Trypsins zum chromogenen Substrat entspricht (vergl. 3.1.6, Tab. 4).

Faktorberechnung

Mit Hilfe verschiedener methodischer Ansätze wurde in der jüngeren Vergangenheit bereits versucht, einen universellen, artenunabhängigen biochemischen Indikator zur Charakterisierung des Ernährungszustandes von Fischlarven vorzuschlagen (Ferron & Legett 1994 und dort erwähnte Referenzen). Die Laborexperimente zur Entwicklung und Verifizierung eines Indikators wurden jeweils nur an einer Art oder an einer insgesamt geringen Anzahl von Arten durchgeführt (z.B. Buckley 1979, Fraser 1987, Hjelmeland et al. 1984, Clemmensen 1988, Ueberschär 1988). Dabei hat sich gezeigt, dass es bedeutende artspezifische Unterschiede gibt, die zum Teil im Zusammenhang mit endogenen Faktoren wie unterschiedlichen Entwicklungsgeschwindigkeiten stehen, aber auch mit abiotischen Bedingungen verknüpft sind. Die meisten Indikatoren reagieren auf Unterschiede in der Umgebungstemperatur, bei der die Fischlarven aufwachsen. Beim Vergleich der Ernährungszustände von Fischlarven einer Art, die z.B. bei unterschiedlichen Temperaturen aufgewachsen sind, können diese Indikatoren deshalb keine vergleichbaren Ergebnisse liefern. Als Konsequenz daraus ist eine individuelle Laborkalibrierung für eine Art unter genau denjenigen abiotischen Bedingungen notwendig, die den Bedingungen entsprechen, bei denen die zu untersuchenden Fischlarven aufgewachsen sind. Nur so kann exakt die Anzahl hungernder Fischlarven in einer Feldprobe bestimmt werden. Es gibt jedoch eine ganze Reihe von Fischarten, bei deren Larvenkohorten die Feststellung des Ernährungszustandes von Interesse wäre, die im Labor noch nicht aufgezogen werden konnten und für die folglich keine entsprechenden Kalibrierungsdaten vorliegen. Für solche Arten sind die bisher vorgeschlagenen Indikatoren zur Konditionsbestimmung daher nur von eingeschränktem Wert und erlauben im Einzelfall keine exakte Klärung der Frage, mit welchem Anteil Verhungern an den Mortalitätsraten beteiligt ist.

Diese Arbeit hatte sich daher u.a. das Ziel gesetzt, möglichst viele Fischarten mit unterschiedlicher ontogenetischer Entwicklungsgeschichte unter verschiedenen abiotischen Bedingungen im Labor aufzuziehen, die Reaktion der Trypsinaktivität auf verschiedene Ernährungsbedingungen zu beschreiben und mögliche Gemeinsamkeiten herauszufinden, um auf dieser Basis generalisierte Aussagen über die Trypsinaktivität in Reaktion auf verschiedene Ernährungs- und Haltungsbedingungen abzuleiten. Als mathematischer Ansatz wurde ein Quotient aus der Trypsinaktivität von gefütterten und hungernden Larven gebildet (Einzelheiten siehe 2.1.11 und 3.1.5) und als der Faktor einer Art bezeichnet. Der Vergleich der Faktoren von 6 Arten ergab für 4 Arten sehr ähnliche Werte, die Unterschiede waren zum Teil nicht signifikant. Aus den ähnlichen Faktoren wurde ein Mittelwert gebildet und dieser als genereller, artenübergreifender Faktor bezeichnet.

Für die Fischarten, die einerseits im Labor kalibriert werden konnten und für die gleichzeitig Daten aus Feldproben vorlagen, wurde die tatsächliche Anzahl hungernder Larven aus der

direkten Kalibrierung mit dem Anteil hungernder Larven aus der Berechnung über den generellen Faktor verglichen. Zur Berechnung wurde postuliert (vergl. 2.1.11), dass in jeder Feldprobe wenigstens eine Fischlarve zu finden ist, die einen schlechten Ernährungszustand aufweist. Dies trifft bei den Felduntersuchungen dieser Studie bis auf eine Ausnahme (POS 703) auf alle Proben zu. Die vergleichende Überprüfung des generellen Faktors (siehe 3.1.5, Tab. 3) zeigt eine gute Übereinstimmung zwischen dem berechneten Wert und dem über die Kalibrierung direkt ermittelten Wert für den Anteil hungernder Larven in der jeweiligen Feldprobe. Die aufgezeigte Vorgehensweise kann die Lücke schliessen zwischen fehlenden Laborkalibrierungen und dem Bedarf, den Ernährungszustand von Fischlarven aus Feldproben (beispielsweise wichtiger Nutzfischarten) mit Hilfe der Trypsinaktivität bestimmen zu wollen.

In der Tab. 6 sind einige Beispiele aus anderen Feldstudien zur Bestimmung des Ernährungszustandes von Fischlarven mit verschiedenen Methoden zusammengestellt unter Angabe des jeweiligen Anteils hungernder Larven.

Autor	Fischart	Rel. Anteil hungernder Larven	Methode
Clemmesen et al., 1997	<i>Engraulis anchoita</i>	10-52% (5-10mm)	RNA/DNA
Håkanson 1993	<i>Engraulis mordax</i>	6% (6-10mm)	Lipidanalyse
Margulies, 1993	<i>Scombridae</i>	48-55% (4.5mm)	Histologie
McGurk et al. 1993	<i>Clupea pallasii</i>	8-45% (5-7mm)	RNA/DNA
Rooker et al 1997	<i>Sciaenops ocellatus</i>	<5% (5-30mm)	RNA/DNA
Sieg 1995	<i>Engraulis anchoita</i>	5-60% (3-12mm)	Histologie
Theilacker 1986	<i>Trachurus symmetricus</i>	7-70% (3.5-4.5mm)	Histologie
Ueberschär 1995	<i>Sprattus sprattus L.</i>	6-53% (4-20.5mm)	Trypsinaktivität
Ueberschär n.v.	<i>Clupea harengus L.</i>	22-80% (6-21mm)	Trypsinaktivität
Ueberschär n.v.	<i>Sardina pilchardus</i>	22-39% (4-22mm)	Trypsinaktivität

Tab. 6: Beispiele für verschiedene Felduntersuchungen bei denen mit unterschiedlichen Methoden der Ernährungszustand von Fischlarven abgeschätzt wurde (n.v. = nicht veröffentlicht).

In allen Untersuchungen wurden hungernde Fischlarven gefunden. Aufgrund solcher Ergebnisse ist die Annahme berechtigt, in Feldproben immer von einigen hungernden Larven ausgehen zu können, deren Trypsinaktivitäten als Multiplikator für den Faktor verwendet werden können, um jeweils den Grenzwert für hungernde Larven festzulegen.

Mit Ausnahme der Verhältnisse bei Herings- und Steinbuttlarven wurde mit zunehmender Larvenlänge eine Veränderung des Faktors beobachtet. Dieser Anstieg des Quotienten aus

den Werten für gefütterte und hungernde Larven ergibt sich aus der Tatsache, dass die Trypsinaktivität nicht linear mit der Larvenlänge ansteigt. Diese Veränderung bedeutet in der Praxis, dass für genaue Ergebnisse bei der Anwendung des Faktors die mittlere Länge der Fischlarven in der jeweiligen Feldprobe berücksichtigt werden muss.

Methodenoptimierung

Die hier entwickelte biochemische Analytik zur Bestimmung der Trypsinaktivität war ausreichend empfindlich, um die Trypsinaktivität auch in den jüngsten Stadien der untersuchten Fischlarven bestimmen zu können. Der Trypsingehalt der jüngsten hier untersuchten Larvenstadien liegt jedoch dicht an der Nachweisgrenze für den Aktivitätsassay. Damit erhöht sich die Messungengenauigkeit. Um die Präzision in diesem Bereich zu verbessern und um die Trypsinaktivität auch in den Larven von Fischarten messen zu können, die noch geringere Trypsingehalte aufweisen als die Larven der hier untersuchten Arten, wurde parallel zur Routineanalyse nach Möglichkeiten zur Steigerung der Empfindlichkeit des Aktivitätsassays gesucht.

Eine technische Möglichkeit zur Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor 2 bis 2.5 wurde durch den Ersatz der Normalküvetten durch verspiegelte Küvetten erreicht. Diese Verbesserung hat den Vorteil, dass keine Änderungen an der Analytik selber (Substanzen, Volumina, Inkubationszeit und Temperatur) vorgenommen werden müssen.

Eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit der Analytik kann durch die Verwendung eines fluorogenen Substrates erhöht werden, das noch spezifischer für Fischlarventrypsin ist als das Substrat CBZ-L-Arg-MCA. Dabei handelt es sich um ein weiteres Derivat vom L-arginin-4-methylcoumarinyl, das Benzoyl-L-arginin-4-methylcoumarinyl (BZ-L-Arg-MCA). Die fluoreszierende Gruppe ist dieselbe wie beim Substrat CBZ-L-Arg-MCA. Dieses Substrat wurde von Zimmermann et al. (1977) neben der Synthese von CBZ-L-Arg-MCA in Form des Racemates BZ-DL-Arg-MCA (Gemisch aus gleichen Anteilen der DL-Isomere) vorgestellt. In dieser Form war das Substrat schwer löslich und deutlich weniger spezifisch für Trypsin als das CBZ-L-Arg-MCA (etwa 10fach geringere Empfindlichkeit, Zimmermann 1977). Da die natürlich vorkommenden Proteine aus L-Aminosäuren bestehen, ist dieses biochemische Verhalten zu erwarten. Dieses Substrat wurde deshalb für die Analysen in dieser Studie nicht in Betracht gezogen. Erst als der L-Enantiomer, das BZ-L-Arg-MCA, in kommerzieller Qualität erhältlich war, wurden Experimente zur Spezifität dieses Substrates durchgeführt. Um die Eigenschaften dieses Substrates mit denen vom CBZ-L-Arg-MCA in Bezug auf die Spezifität zu vergleichen, wurden Versuche mit Standardtrypsin und Fischlarventrypsin aus Herings- und Steinbuttlarven durchgeführt. Dabei ergab sich ein nicht erwartetes Ergebnis: dieses Substrat ist für Trypsin aus Rinderpankreas deutlich weniger spezifisch als das CBZ-L-Arg-MCA, für Trypsine aus Fischlarven aber deutlich spezifischer als das CBZ-L-Arg-MCA. Die dabei ermittelten enzymkinetischen Parameter (Tab. 4) bestätigen die höhere Spezifität des BZ-L-Arg-MCA und die bis zu etwa 3fach höhere katalytische Effizienz (K_{cat}/K_m) für Fischlarventrypsin. In den getesteten Substratkonzentrationen

konnte keine Substrathemmung festgestellt werden. Linearität und Proportionalität entsprechen dem Verhalten des Substrates CBZ-L-Arg-MCA. Damit wird das Substrat BZ-L-Arg-MCA für zukünftige Trypsinaktivitätsmessungen an Fischlarven empfohlen.

Auf eine methodische Erweiterung des Trypsinaktivitätsassays, die die Bestimmung der inaktiven Vorstufe Trypsinogen mit einbezieht, konnte nur in einigen exemplarischen Experimenten eingegangen werden. Die Experimente wurden mit kommerziell erhältlichem Trypsinogen und Enterokinase durchgeführt. Dabei wurde gezeigt, dass in Verbindung mit dem vorgestellten Aktivitätsassay die Aktivierung und Quantifizierung von Trypsinogen möglich ist. Eine Kombination aus der Messung von Trypsinogen und Trypsin an einer einzelnen Fischlarve erlaubt eine genauere Bestimmung der Dauer einer Hungerperiode. Das geht aus einer Studie (Ueberschär et al. 1992) hervor, auf die weiter oben eingegangen wurde (Interkalibrierungsversuche). Im Pankreas von kurzzeitig (bis zu 68 Stunden) unter Futterentzug gehaltenen 53 Tage alten Heringslarven wurde mit dem RIA eine 15fach höhere Trypsinogenmenge im Vergleich zum Trypsingehalt im Darmtrakt gemessen. Gleichzeitig wurde mit dem Aktivitätsassay im Darmtrakt dieser Larven etwa nur 20% der Trypsinaktivitäten von regelmässig gefütterten Larven festgestellt. Nur kurze Zeit hungernde Larven stoppen die Sezernierung von Trypsinogen in den Darmtrakt und bilden dadurch einen Trypsinogenspeicher im Pankreas (siehe Abb. 3). Dies ermöglicht eine schnelle Reaktion auf eine Futteraufnahme nach einer Hungerperiode und damit eine hohe Effizienz beim Verdauungsprozess. Im Pankreas von gefütterten Larven dagegen wurde mit dem RIA nur eine etwa doppelt so grosse Menge Trypsinogen gemessen, verglichen mit der Menge von Trypsin im Darmtrakt. Dieses Verhältnis von Trypsin zu Trypsinogen lässt sich als eine kontinuierliche Sezernierung von Trypsinogen aus dem Trypsinogenspeicher im Pankreas in den Darmtrakt in Reaktion auf eine Futteraufnahme interpretieren. Um die Produktion von physiologisch unsinnig hohen Trypsinogenmengen zu verhindern, wird ein sekretorischer Regelkreis vermutet: ist eine bestimmte Trypsinkonzentration im Darmtrakt erreicht, wird die weitere Sekretion von Trypsinogen gestoppt. (Schneemann & Lyman 1975, Pedersen et al. 1987). Pedersen et al. (1987) beschreiben bei ähnlichen Experimenten mit Heringslarven, dass die Trypsinogenmenge im Pankreas bei länger hungernden Larven stark abnimmt, was der in der Einleitung beschriebenen Hypothese entspricht.

4.2 Trypsinaktivitätsbestimmung - Laborexperimente

Die Larven mariner Fischarten können als kleinste autark funktionierende Vertebraten gelten (Kotrschal et al. 1990, Osse 1990). Ein Gewichtszuwachs während der Entwicklung zum adulten Fisch um das 10^5 bis 10^7 -fache weist auf einen sehr geringen Entwicklungsgrad der jüngsten Larvenstadien hin. Ausgehend von dieser Tatsache wurde vermutet, dass vor allem wegen des noch unvollständig entwickelten Verdauungstraktes die jüngeren Larven mariner Fischarten in der Regel nur mit lebendem Zooplankton aufgezogen werden können (Tanaka 1969, Govoni et al. 1986) weil sie keine oder noch nicht genügend endogene Verdauungsenzyme produzieren, um Kunstfutter effizient verdauen zu können. Daraus wurde

abgeleitet, dass die frühen Larvenstadien für den effizienten Aufschluss von aufgenommener Nahrung auf die Zufuhr exogener Verdauungsenzyme aus den Futterorganismen angewiesen sind (z.B. Kawai & Ikeda 1973, Dabrowski 1979, Lauff 1983, Lauff & Hofer 1984, Munilla-Moran et al. 1990, Kolkovski et al. 1993).

Neuere Untersuchungen zeigen am Beispiel von Wolfsbarschlarven, dass die Verdauungsenzymkapazität von jungen Fischlarven prinzipiell ausreicht um Kunstfutter effizient aufschliessen zu können (Cahu & Infante 1997, Nolting 1997, Nolting et al. 1999). Durch die Entwicklung und Anwendung hochsensibler Methoden ist der individuelle Nachweis des im Larvenstadium wichtigsten proteolytischen Verdauungsenzyms Trypsin schon in den jüngsten Larvenstadien verschiedener Fischarten gelungen (Hjelmeland 1984, Hjelmeland & Jørgensen 1985, Pedersen et al. 1987, Ueberschär 1988, Oozeki & Bailey 1995). In dieser Arbeit wurde für 6 Arten gezeigt, dass proteolytisches Verdauungsenzympotential bereits kurz nach dem Schlupf zur Verfügung steht. Damit kann die Hypothese als überholt gelten, dass bei marinen Fischlarven zum Zeitpunkt der Umstellung von endogener auf exogene Ernährung die Kapazität proteolytischer Verdauungsenzyme, hier speziell von Trypsin, nicht ausreicht um aufgenommene Nahrung verdauen zu können. Es kann angenommen werden, dass im wesentlichen andere Nahrungskomponenten (als Trypsin aus Lebendfutter) die Qualität der Nahrung und damit die Überlebensraten von Fischlarven beeinflussen.

Mit dem individuellen Nachweis von Trypsin in den Larvenstadien jeden Alters war die wichtigste Voraussetzung erfüllt, um prüfen zu können, ob die Trypsinaktivität als Indikator für die Darstellung des Ernährungszustandes und der Fressaktivität von Fischlarven geeignet ist. Weiterhin wurde gefordert, dass die Trypsinaktivitäten von gefütterten und hungernden Fischlarven in allen Altersstufen signifikant voneinander unterschiedlich sind und dass es keine prinzipiellen Unterschiede in der Reaktion auf unterschiedliche Ernährungsbedingungen zwischen den Arten gibt.

Im folgenden Teil werden die Ergebnisse aus den Laborexperimenten unter den oben genannten Gesichtspunkten interpretiert. Im einzelnen wurde die ontogenetische Entwicklung der Trypsinaktivität in Abhängigkeit vom Futterregime untersucht, zum Alter sowie der Larvenlänge in Beziehung gesetzt und die individuelle tages- und fütterungszeitabhängige Reaktion der Trypsinaktivität betrachtet. In einzelnen Fällen wird auch der Einfluss der Temperatur als abiotischer Faktor der Variabilität für die Trypsinaktivität während der Larvenaufzucht diskutiert.

Ontogenetische Entwicklung der Trypsinaktivität

Die in den Laborexperimenten untersuchten Arten unterscheiden sich in ihrer individuellen Entwicklungsphysiologie und stammen teilweise aus ganz unterschiedlichen klimatischen Verhältnissen. Der zeitliche Verlauf bei der Zunahme der Trypsinaktivität und der absoluten Menge produzierten Trypsins zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Arten bezogen auf die zeitliche Skala. Die Abb. 96 zeigt die mittlere Zunahme der Trypsinaktivität bezogen auf

die Larvenlänge für die bei hoher Futterdichte aufgezogenen Gruppen. Steinbuttlarven zeigen die zeitlich gesehen schnellste Zunahme, Heringslarven zeigen den geringsten Anstieg bei der Trypsinaktivität im vergleichbaren Zeitrahmen.

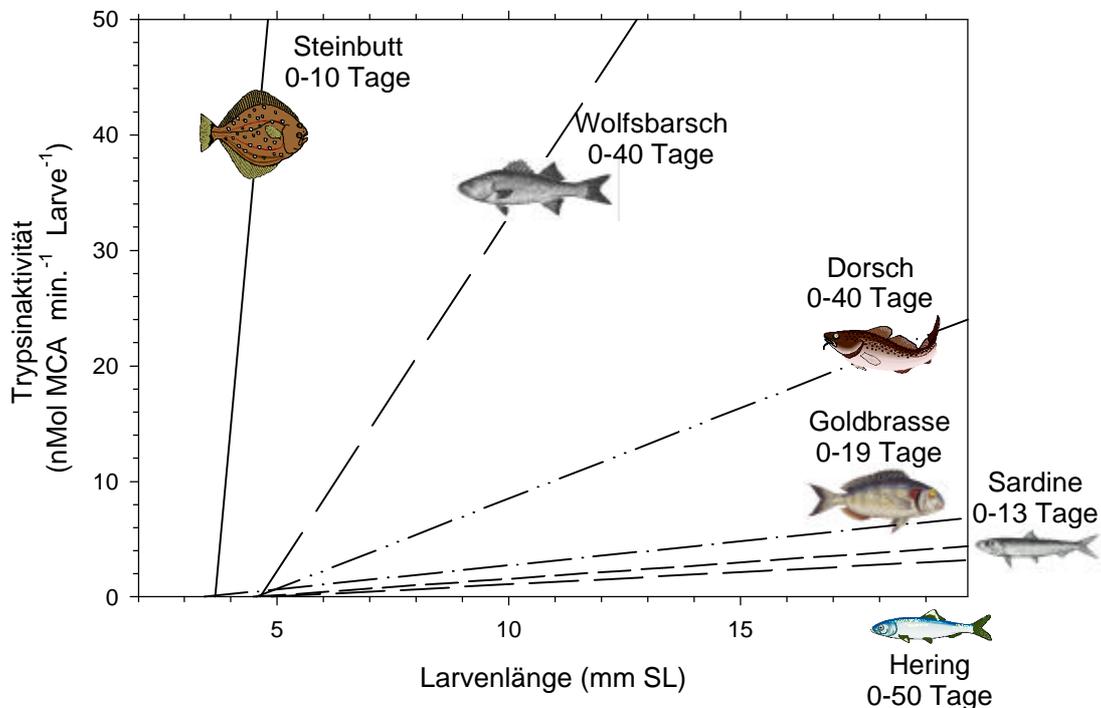


Abb. 96: Vergleich der Zunahme der Trypsinaktivität mit der Larvengröße bei gefütterten Larven aller in dieser Arbeit im Labor kalibrierten Arten. Die bei diesem Vergleich berücksichtigte Lebensspanne (Larvenalter) ist bei der jeweiligen Art angegeben. Die bei der Aufzucht tatsächlich erreichte Larvenlänge ist bei einigen Arten geringer als die maximale Skalierung angibt. Die oberhalb der maximal erreichten Länge liegenden Werte auf den Regressionsgeraden sind daher für den Vergleich extrapoliert. Altersabhängige Schwankungen der Trypsinaktivität wurden für diesen Vergleich nicht berücksichtigt

Die nach mehreren Tagen Futterentzug verbleibenden basalen Trypsinaktivitäten unterscheiden sich ebenfalls zwischen den Arten. Die Arten, deren natürliche Lebensräume von relativ hohen Temperaturen geprägt sind, wie die der Goldbrasse und der brasilianischen Sardine, verlieren am meisten von der bei gefütterten Larven aufgebauten Trypsinaktivität im betrachteten Zeitraum (Abb. 97). Dieser Zusammenhang bedeutet, dass Fischlarven in borealen Gebieten mit eher geringen Wassertemperaturen längere Zeit hungern können, und damit schlechte Ernährungsbedingungen auch längere Zeit überleben können. Der Grund ist in dem bei niedrigen Temperaturen verlangsamtem Metabolismus bei ektothermen Organismen zu sehen. In verschiedenen Arbeiten wurde dieser Zusammenhang untersucht und festgestellt, dass mit zunehmender Temperatur die Wachstumsrate steigt, gleichzeitig aber auch die Mortalitätsrate zunimmt (z.B. Houde 1989, McGurk 1984). Fische

und Fischlarven sind im Gegensatz zu höheren Vertebraten in der Lage, in Phasen mit unzureichendem Futterangebot zur Deckung des Metabolismus körpereigene Proteine zu mobilisieren um zu überleben (Love 1970). Im Extremfall kann dies zu einer Assimilation des exokrinen Teil des Pankreas führen (O'Connell 1976). Es können dann keine Enzyme mehr produziert werden und die Larve hat den "point of no return" erreicht. Die durch höhere Temperaturen gesteigerten Stoffwechselraten beschleunigen die Assimilation körpereigenen Proteins unter Hungerbedingungen. Dies kann bedeuten, dass Larven von in subtropischen und tropischen Gebieten lebenden Fischarten bei zu geringem Futterangebot grundsätzlich rascher verhungern als diejenigen von Arten aus gemässigten Breiten. McGurk (1984) hat in Übereinstimmung mit dieser Einschätzung in einem Vergleich für 25 Arten gezeigt, dass die Zeitspanne vom Ende der Dottersackphase bis zum irreversiblen Verhungern um so kürzer ist, je höher die natürliche Umgebungstemperatur ist. Es ist anzunehmen, dass diese Erkenntnis auch für ältere Larven unter Futterentzug gilt.

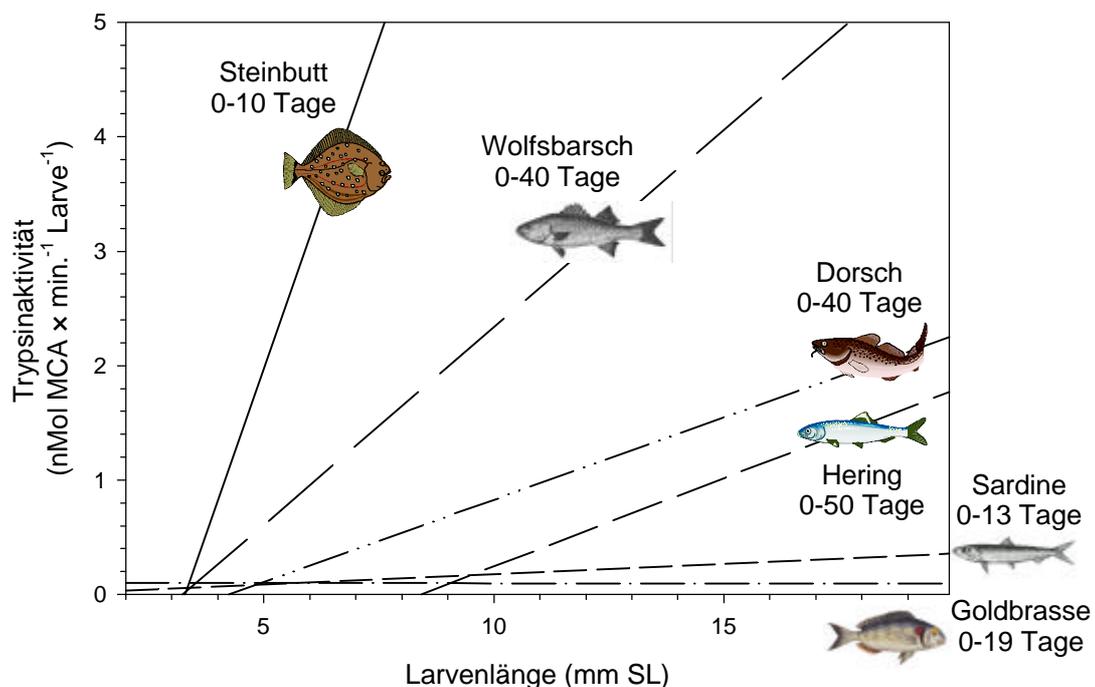


Abb. 97: Vergleich der nach mehreren Tagen Futterentzug verbliebenen Trypsinaktivität in Abhängigkeit von der Larvenlänge für alle im Labor aufgezogenen Arten. Die bei diesem Vergleich berücksichtigte Lebensspanne (Larvenalter) ist bei der jeweiligen Art angegeben. Die bei der Aufzucht tatsächlich erreichte Larvenlänge ist bei einigen Arten geringer als die maximale Skalierung angibt. Die oberhalb der maximal erreichten Länge liegenden Werte auf den Regressionsgeraden sind daher extrapoliert.

Aus den Ergebnissen dieser Studie kann abgeleitet werden, dass die Trypsinaktivität bei Fischlarven mit dem Alter nicht kontinuierlich zunimmt, sondern Schwankungen unterworfen ist, dessen Verlauf ontogenetisch vorbestimmt zu sein scheint. Obgleich sich die hier unter-

suchten Arten morphologisch und physiologisch unterschiedlich entwickeln, wurde für alle Arten ein ähnlicher Verlauf bei der Entwicklung der Trypsinaktivität mit zunehmendem Alter beobachtet. Der Vergleich der Entwicklung der Trypsinaktivitäten bei Herings- und Steinbuttlarven bei jeweils zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Versuchsreihen zeigt, dass die Schwankungen nicht zufällig sein können (vergl. Abb. 58a & Abb. 65a). Für Steinbuttlarven wurde beim Vergleich mit früheren Experimenten zur Trypsinaktivität ein ähnlicher Verlauf wie bei den Ergebnissen aus dieser Studie festgestellt (Ueberschär 1985).

Die Entwicklung der Trypsinaktivität mit dem Alter lässt sich auf der Basis der hier untersuchten Arten während der Larvalentwicklung vom Schlupf bis zur beginnenden Metamorphose grob in 4 Phasen einteilen⁷: in der Phase I nach dem Schlupf wird zunächst ein relativ hohes Potential an Verdauungsenzymkapazität aufgebaut, dessen Amplitude unabhängig vom Fütterungsregime ist. Die ungefütterten Larven zeigen in dieser Phase dasselbe Trypsinmuster wie die gefütterten Larven. Während der Phase I kann es bis etwa zum 10. Tag nach dem Schlupf keine Verhungerungserscheinungen geben, da die Larven noch über genügend endogene Energiereserven verfügen. Eine Unterscheidung von hungrigen und gefütterten Larven ist deshalb während dieser Phase nicht möglich. Die Phase I dauert bei den hier untersuchten Arten etwa 10-14 Tage, mit Ausnahme der Larven der brasilianischen Sardine. Diese Art stammt aus Gebieten mit hohen Wassertemperaturen, Temperaturen bis zu 28°C während der Larvalentwicklung können als normal angenommen werden. Die ontogenetische Entwicklung läuft bei diesen hohen Temperaturen offensichtlich etwa doppelt so schnell ab. In der Phase II, während der die Larven bereits vollständig auf exogene Nahrung angewiesen sind, ist ein Rückgang der Trypsinaktivität zu beobachten. Der Bedarf an Trypsin und die Trypsinogensynthese ist in dieser Phase offenbar nicht ausbalanciert. Bei Steinbuttlarven wurden beispielsweise in dieser Phase trotz hoher Futterdichten und optimalen abiotischen Bedingungen regelmässig besonders hohe Mortalitätsraten beobachtet (Witt, pers. Mitteilung und eigene Untersuchungen). In der Phase III ist ein ambivalentes Verhalten möglich, die Enzymaktivität steigt unter optimalen Futterbedingungen wieder an und die Trypsinogensynthese, -sekretion und -aktivierung orientieren sich am Bedarf, d.h. an der Menge der aufgenommenen Nahrung. In der Regel ist diese Phase bei entsprechender Ernährungslage mit einem schnellen Wachstum verbunden. Es kann in dieser Phase aber auch noch einmal zu einer Trypsinabnahme kommen, wie am Beispiel der Heringslarven zu sehen ist (vergl. Abb. 58), was bei den zugrundeliegenden Versuchen auf ein qualitativ nicht ausreichendes Futterangebot zurückgeführt werden kann. Die Phase IV steht im engem Zusammenhang mit der Ausbildung eines funktionellen Magentrakts und der Produktion von Pepsin. In dieser Phase kann die Trypsinaktivität offenbar reduziert werden, weil die Denaturierung der Nahrungsproteine bei der Magenpassage und die dort stattfindende Vorverdauung die Effizienz der Hydrolyse von Proteinmolekülen im Darm

⁷ Es sei auf die entsprechenden Abbildungen "Verlauf der Trypsinaktivitäten mit dem Alter" für die einzelnen Arten im Ergebnisteil hingewiesen (z.B. Abb. 55, Heringslarven).

durch Trypsin erhöht. Denaturierte Proteine können prinzipiell leichter enzymatisch aufgeschlossen werden (Karlson 1980). Die Phase IV wurde in dieser Studie nur bei den Arten beobachtet, die bis zur beginnenden Metamorphose aufgezogen werden konnten. In der Literatur wird diese Phase wegen der tiefgreifenden morphologischen und physiologischen Veränderungen auch als eine weitere kritische Phase während der Larvalzeit von Fischen diskutiert (Thorisson 1992).

Die Abb. 98 zeigt schematisch am Beispiel von Steinbuttlarven den Verlauf der Trypsinaktivität und die Einteilung in die einzelnen Phasen. Der zeitliche Verlauf, die Dauer und Ausprägung der einzelnen Phasen können je nach Fischart variieren, aber das Grundmuster ist wahrscheinlich immer ähnlich. Die Theorie von klaren ontogenetischen Mustern bei der Ausbildung der Verdauungsenzymkapazität in der larvalen Phase, insbesondere von Trypsin, wird von den Ergebnissen anderer Untersuchungen unterstützt (Hjelmeland et al. 1984, Pedersen et al. 1987, Ugelstad et al. 1995, Hjelmeland 1995). Das Bild von der Entwicklung der Trypsinaktivität in diskreten Abschnitten passt zu der von Balon (1985) für Fischlarven vorgestellten "theory of saltatory ontogeny" mit sprunghaften Veränderungen individueller physiologischer und/oder verhaltensbiologischer Eigenschaften. In mehreren Studien wurde die sprunghafte Larvalentwicklung anhand der Entwicklung morphologischer und physiologischer Eigenschaften beschrieben und unter ökologischen Gesichtspunkten diskutiert (McElman & Balon 1985, Paine & Balon 1985). Das Ende der ersten Phase ist z.B. bei Steinbuttlarven morphologisch gesehen mit der vollständigen Ausbildung der Darmschleife verbunden (Cousin & Laurencien, 1985).

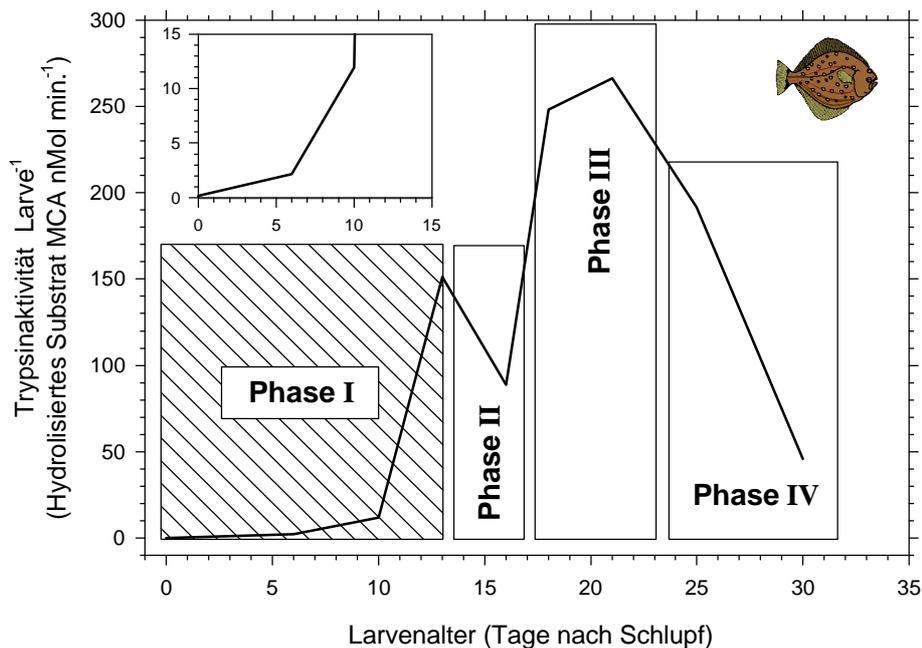


Abb. 98: Schematische Darstellung der Phasentheorie am Beispiel der sehr ausgeprägten Entwicklung der Trypsinaktivität bei Steinbuttlarven. Phase I (die schraffierte Fläche wird darüber als vergrößerter Ausschnitt gezeigt) steht für die Dottersackphase und den Beginn der exogenen Nahrungsaufnahme. Phase II kann wegen einer Reduktion der Verdauungsenzymkapazität als eine kritische Phase bezeichnet werden. Diese Phase ist oft verbunden mit einer Wachstumsdepression und hohen Mortalitätsraten. In Phase III sind Trypsinbedarf und Produktion ausbalanciert, diese Phase ist bei optimaler Futterversorgung durch hohe Zuwachsraten gekennzeichnet. In Phase IV beginnt die Metamorphose und ein Teil der Trypsinaktivität wird bereits durch die Aktivität von Pepsin im Magen ersetzt.

Der Verlauf der Trypsinaktivitätsschwankungen scheint während der Larvalentwicklung ontogenetisch weitgehend festgelegt zu sein, die Amplitude der Trypsinaktivität während der jeweiligen Phase ist aber eher von der Menge und Art der aufgenommenen Nahrung abhängig. Dies lässt sich aus dem Verlauf der Trypsinaktivitäten von den bei geringer Futterdichte aufgezogenen Herings- und Steinbuttlarven schließen. Deren Trypsinaktivitätsniveau folgt im Prinzip dem Verlauf der Trypsinaktivitäten von den bei hohen Futterdichten aufgezogenen Larven, jedoch auf einem niedrigerem Niveau. Die Möglichkeit der ontogenetisch bestimmten Schwankungen bei der Verdauungsenzymkapazität wurde in früheren Studien nicht als solche erkannt, sondern als eine Reaktion auf eine ungleichmäßige Futterversorgung verstanden (Ueberschär 1985). Die Beteiligung exogener Enzyme an den Trypsinaktivitätsschwankungen wurde in früheren Untersuchungen für die Larven mariner Arten häufig überschätzt. Die Ergebnisse von Pedersen et al. (1987) bestätigen die Einteilung in phasenweise verlaufende Entwicklungen der Trypsinaktivität für Heringslarven, die mit Copepodennauplien aufgezogen wurden.

Auf der Basis der Einteilungen in Phasen können kritische Perioden für die im Feld aufwachsenden Larven mariner Fischarten unter ökologischen Gesichtspunkten neu definiert werden. Es ist aber noch zu prüfen, ob sich die kritischen Perioden unter Feldbedingungen (z.B. bei feldnahen Versuchen in sog. "enclosures") in gleicher Weise wie für die im Labor aufgezogenen Arten wiederfinden lassen.

Tagesrhythmik der Trypsinaktivität

Biologische Systeme und die darin lebenden Organismen zeigen Oszillationen auf allen Ebenen der Organisation, vom Stoffwechselweg bis hin zur Population und zum Ökosystem. Neben einem arttypischen, endogen gesteuerten Biorhythmus wird das Verhalten durch äussere Einflüsse bestimmt. Bei der Frequenz der Oszillationen lassen sich langfristige Rhythmen im Jahres-, Monats- oder Wochenrhythmus erkennen, daneben sind aber auch die tagesperiodischen Rhythmen ein wichtiger Hintergrund für die zeitlich kleinskaligen physiologischen Veränderungen und Verhaltensweisen von Lebewesen.

Auch Fische und Fischlarven zeigen ausgeprägte tageszeitabhängige Verhaltensmuster deren Steuerung im wesentlichen durch die natürliche Photoperiode gesteuert wird (Manteifel et al. 1978). Von diesem Verhaltensmuster ist insbesondere das Fressverhalten betroffen. Bei Fischlarven mariner Arten ist in der Regel eine diurnale Vertikalwanderung zu beobachten, die mit einem tageszeitabhängigen Fressverhalten, das hauptsächlich durch die Lichtverhältnisse gesteuert wird, verbunden ist (Manteifel et al. 1978, Rannak & Simm 1987, Vinas & Ramirez 1996). Die kurzfristige Steuerung von Trypsinogenproduktion und Trypsinsezernierung scheint vorwiegend durch vom Futter ausgehende Reize gesteuert zu werden. Dabei werden chemische Stimuli durch Nahrungspartikel im Darm der Larven als Hauptreiz angesehen. Eine neuronale Stimulierung ist zwar ebenfalls vorhanden, diese alleine löst jedoch eine eher schwache Trypsinsezernierung aus (Hjelmeland et al. 1988).

In dieser Arbeit wurde experimentell untersucht, wie sich die Trypsinaktivität in Abhängigkeit von Futterraufnahme und Tageszeit verhält. Wie bereits erwähnt, ist eine schnelle Reaktion bei der Trypsinaktivität im Stundenbereich als Antwort auf eine Futterraufnahme zu erwarten. Die Klärung dieser Zusammenhänge ist eine wichtige Voraussetzung, um die Trypsinaktivität in Felduntersuchungen zur Beurteilung von Ernährungszustand und Fressverhalten vor dem Hintergrund tagesperiodischer Rhythmen einordnen zu können.

Für Fischlarven gibt es kaum Untersuchungen zur tagesperiodischen Schwankung der Trypsinaktivitäten (Pedersen et al. 1987). Dagegen gibt es einige Untersuchungen zur tagesperiodischen Variabilität der Trypsinaktivität bei Zooplankton in Bezug auf die Fressaktivität (z.B. Baars & Oosterhuis 1984, Båmstedt 1984, 1988). Dabei wurde in einigen Untersuchungen ein Zusammenhang zwischen Trypsinaktivität, Fressaktivität und Füllungsgrad des Verdauungstraktes gefunden. Bei Fischlarven werden ähnliche Zusammenhänge erwartet. Bei Experimenten mit unterschiedlich alten, kontinuierlich gefütterten Heringslarven wurde in Reaktion auf zwei morgendliche Fütterungen ein deutlicher Anstieg der Trypsinaktivität in

der Zeitskala von etwa 30 - 60 min. beobachtet. Einen Zusammenhang mit der Art der Futterorganismen (Rotatorien und *Artemia*-Nauplien) konnte jedoch nicht festgestellt werden. Ältere Larven zeigen eine ausgeprägtere Reaktion, da sie deutlich mehr Futterorganismen aufnehmen können und dies wiederum zu einer höheren Trypsinsezernierung in das Darmlumen führt. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Anzahl von Nauplien im Darmtrakt von Heringslarven mit der Trypsinaktivität linear positiv korreliert ist. Pedersen et al. (1987) beobachteten ein ähnliches Verhalten bei der Bestimmung der Trypsinmenge bei Heringslarven nach der Fütterung, bei hungernden Larven konnte dagegen keine Änderung bei der Trypsinmenge im Tagesverlauf festgestellt werden. Damit wird die Hypothese zur Dynamik der Trypsinaktivität in Fischlarven unter Futter- und Hungerbedingungen, wie sie in der Einleitung vorgestellt wurde, bestätigt. Kontinuierlich gefütterte Fischlarven zeigen, je nach Anzahl aufgenommenener Futterorganismen, eine mehr oder weniger regelmässige Oszillation bei der Trypsinaktivität im Tagesverlauf, die aber stets oberhalb des Niveaus von vergleichbaren aber hungernden Larven derselben Art bleibt (vergl. z.B. Abb. 78).

Auch die an Steinbuttlarven durchgeführten Experimente zeigen im Tagesverlauf eine von der Fütterung abhängige Reaktion der Trypsinaktivität. Bei 12-Tage alten Steinbuttlarven, die bereits zwei Futterrationen erhalten hatten, wurde jedoch festgestellt, dass eine dritte Ration keinen positiven Effekt mehr auf die Trypsinaktivität hatte (siehe Abb. 80). Nach der dritten Fütterung wurde sogar eine geringe Abnahme der Trypsinaktivität beobachtet. Dies Ergebnis weist darauf hin, dass die Verdauungsenzymkapazität der 12-Tage alten Larven erschöpft war. Steinbuttlarven dieses Alters befinden sich im Übergang von Phase I zur Phase II, bei diesem Entwicklungsstand der Larven ist die Trypsinogenproduktion offensichtlich noch nicht mit der Sezernierung korreliert (Hjelmeland 1995). Andererseits kann eine endogene Komponente zur tageszeitabhängigen Regulation der Trypsinaktivität für die Reduktion der Trypsinsezernierung am späten Nachmittag verantwortlich sein. Ob es eine solche endogene Regelung gibt, liess sich unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht herausfinden.

Für Felduntersuchungen liefern die Ergebnisse diese Experimente wichtige Informationen zur Bewertung der festgestellten Trypsinaktivitäten. Einerseits kann aus der Grössenordnung und individuellen Variabilität der Trypsinaktivität auf das Fressverhalten der Larven geschlossen werden. Andererseits können fehlende Korrelationen zwischen hohen Zooplanktonabundanzen und der Trypsinaktivität auf eine tageszeitlich abhängige endogen gesteuerte Limitierung der Sezernierung von Trypsin zurückgeführt werden. Pedersen et al. (1987) fanden ein Plateauverhalten des Trypsinaktivitätsniveaus bei Heringslarven, die konstant bei hoher Futterdichte gehalten wurden. Bei der künstlichen Aufzucht von Fischlarven können diese Erkenntnisse von grossem praktischem Wert sein. Eine systematische Untersuchung der von Futterration, Futterart und Tageszeit abhängigen Trypsinausschüttung kann helfen, Fütterungszeit und -häufigkeit pro Tag besser auf die Verdauungsenzymkapazität und -oszillation der jeweiligen Art abzustimmen und zu optimieren.

Bei Experimenten mit 16- Tage alten Dorschlarven wurde die Trypsinaktivität im Tagesverlauf in Abhängigkeit von unterschiedlichen Futterdichten verglichen, und es wurde festgestellt, dass die Reaktion der Trypsinaktivität auf Futteraufnahme eng mit der jeweils angebotenen Futterdichte korreliert war (Abb. 83). Eine hohe Futterdichte führte zu einem ausgeprägten Anstieg der Trypsinaktivität, eine um den Faktor 10 geringere Futterdichte dagegen führte nur zu einer schwachen Reaktion. Bei der Hungergruppe war keine tageszeitliche Reaktion erkennbar, was die Ergebnisse von Pedersen et al. (1987) an Heringslarven bestätigt. Bei allen Gruppen ist etwa 9 Stunden nach der Fütterung das gleiche niedrige Trypsinaktivitätsniveau erreicht. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für eine durch die Futterration beeinflusste Steuerung der Trypsinaktivität im Tagesverlauf.

Um zu prüfen, wie schnell sich die Trypsinaktivität nach einer Hungerperiode re-etabliert, wurden Herings- und Steinbuttlarven nach einer Hungerperiode wieder gefüttert und die Trypsinaktivität im Tagesverlauf beobachtet. Bei beiden Arten erreicht die Trypsinaktivität nach der ersten Fütterung in kurzer Zeit (vergleichbar schnell wie dauerhaft gefütterte Gruppen) einen deutlich oberhalb der Grenze für hungernde Larven liegenden Wert. Steinbuttlarven reagieren ausgeprägter auf die Wiederaanfütterung (Abb. 81 & Abb. 82) als Heringslarven (Abb. 79), was vermutlich auf artspezifische Unterschiede im Stoffwechselliveau zurückzuführen ist. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass 19- und 26- Tage alte Steinbuttlarven bzw. die 37- Tage alten Heringslarven auch nach 3 bzw. 4 Tagen Futterentzug noch keine irreversiblen Schäden im exokrinen Teil des Pankreas erlitten haben. Diese Larven waren auch nach einer relativ langen Hungerperiode sofort in der Lage, auf ein Futterangebot mit der Sezernierung von proteolytischen Verdauungsenzymen zu reagieren. Die kurzfristige Bereitstellung von Trypsin ist durch die Speicherung von relativ grossen Mengen Trypsinogens im Pankreas möglich. Bei 50 Tage alten Heringslarven, die etwa 3 Tage lang gehungert hatten, wurde eine etwa 5fach grössere Menge Trypsinogen im Pankreas festgestellt verglichen mit dem Trypsingehalt im Darmtrakt von gleichaltrigen, gefütterten Heringslarven (Ueberschär et al. 1992).

Der Gründe, die zum schnellen Anstieg der Trypsinaktivität bei gefütterten Fischlarven im Stundenrhythmus führen lassen sich eindeutig auf Fütterungszeit und Ration zurückführen. Für die genauso rasche Abnahme lassen sich aber verschiedene Erklärungen finden. Trypsin kann mit den Faeces ausgeschieden werden. Pedersen & Hjelmeland (1988) haben jedoch bei Heringslarven gezeigt, dass mit der Abgabe von 1-3 verdauten Copepoden weniger als 1% Trypsinverlust verbunden ist. Eine andere Möglichkeit ist die vom energetischen Standpunkt sinnvolle Nutzung, nicht benötigtes Trypsin im Darmlumen zu resorbieren. Trypsin kann im Darmtrakt der Larven in Folge fehlenden Substrates (Futterorganismen) durch Autohydrolyse abgebaut werden (Pedersen & Hjelmeland 1988). Auf diese Weise können die Enzymproteine für den Metabolismus und den Aufbau von neuem Trypsinogen genutzt werden. Ein weiterer möglicher Mechanismus ist die Bindung von Trypsin

an das Darm-epithel, wodurch das Trypsin gegen Autohydrolyse geschützt ist. Bei erneuter Futteraufnahme ist dann mit dem Übergang von membrangebundenem Trypsin auf das Substrat (Futterpartikel) eine rasche Bereitstellung von Trypsin gewährleistet (Sandholm & Scott 1979, Seiderer et al. 1987). Membrangebundenes Trypsin ist zwar im Darm noch vorhanden, aber in einem Aktivitätsassay nicht messbar, da die Bindungsstellen am Enzym für das Substrat blockiert sind.

Individuelle Variabilität

In den vorangegangenen Abschnitten wurde die ontogenetische Entwicklung sowie die tagesrhythmischen Oszillationen der Trypsinaktivität bei heranwachsenden Larven diskutiert, die beide in groben Zügen vorhersagbar sind und prinzipiell alle Larven einer Kohorte gleichermaßen betreffen. Daneben ist aber auch eine individuelle Variabilität der Trypsinaktivität zu berücksichtigen, die nicht vorhersagbar ist. Dies gilt gleichermaßen auch für andere Indikatoren des Ernährungszustandes, wie z.B. dem RNA/DNA Verhältnis. Die durch die Analyse der Trypsinaktivität einzelner Fischlarven festgestellten individuellen Varianzen wurden bei allen Arten gefunden, wobei nur Proben verglichen wurden, die immer zu einer bestimmten Tageszeit genommen wurden. Die Gründe, weshalb ein Teil der Larven einer Kohorte trotz Gleichbehandlung und hoher Futterdichten immer Trypsinaktivitäten aufweist, die eher typisch für geringe Futterdichten oder Futterentzug sind, lassen sich nicht eindeutig erklären. Der Grund für die individuelle Variabilität ist wahrscheinlich auf das Zusammenwirken verschiedener Ursachen zurückzuführen. Eine Ursache ist die individuelle Komponente bei der Wachstumsgeschwindigkeit von Fischlarven. Fischlarven durchlaufen auf dem Weg zum juvenilen Fisch tiefgreifende morphologische und physiologische Veränderungen (Govoni et al. 1986, Blaxter 1988, Segner et al. 1994). Die Geschwindigkeit, mit der diese Veränderungen stattfinden, sind, auf das Individuum bezogen, nicht zwangsläufig zeitlich synchronisiert. Daraus entstehen Unterschiede in der Organentwicklung und -differenzierung was als natürliches Phänomen zu verstehen ist (Sieg 1995). Der unterschiedliche Entwicklungsstand der Larven bei gleichem Alter drückt sich morphologisch in der zunehmenden Variabilität der Larvengrösse mit ansteigendem Alter bei gleichbehandelten Larven aus, damit verbunden ist eine unterschiedlich entwickelte Fähigkeit zur Trypsinogensynthese. Die Veränderungen werden ausserdem von einer mehrfachen Adaptation an ein jeweils neues Grössenspektrum der Nahrung begleitet, hierbei kann eine unterschiedlich schnelle Fähigkeit zur Umstellung auf neue Futterorganismus eine weitere Quelle für die Variabilität der Entwicklungsgeschwindigkeit gegeben sein. Ein anderer Faktor kann eine individuell unterschiedliche Resistenz gegen verschiedene Arten von Stress sein, der insbesondere bei der Laboraufzucht aus verschiedenen Gründen auftreten kann (z.B. Transport, Umsetzung, Form und Farbe der Haltungsbecken, unnatürliche Beleuchtungsverhältnisse, Temperaturschwankungen), was ebenfalls zu physiologischen Veränderungen in der Effizienz des Stoffwechsels führen kann. Hinweise auf die Stressempfindlichkeit von Fischlarven und deren Konsequenzen für die Trypsinaktivität werden genauer in einem folgenden Abschnitt diskutiert.

Eine weitere bedeutende Ursache für die individuelle Variabilität der Trypsinaktivität ist das täglich unterschiedliche Fressverhalten bei Larven gleichen Alters, dass sich u.a. aus dem individuellen Entwicklungsstand ergibt. Dabei gilt prinzipiell, je mehr Futterorganismen im Darmtrakt der Larven festgestellt werden, desto höher ist die Trypsinaktivität, wobei die mit der Nahrung aufgenommenen exogenen Enzyme von untergeordneter Bedeutung sind. Der Einfluss der aufgenommenen Futtermenge auf die Trypsinaktivität wird als Hauptursache für die individuellen Varianzen angesehen. Da das Fressverhalten einzelner Larven in einer Kohorte sehr unterschiedlich ist, können grosse individuelle Variabilitäten innerhalb der Gruppen von gefütterten Larven entstehen. Diese Variabilität kann in Felduntersuchungen vor allem dann genutzt werden, wenn keine Laborkalibrierung für die zu untersuchende Art vorliegt (und die für hungernde bzw. gut ernährte Larven typischen Aktivitätswerte nicht bekannt sind), um z.B. einen Überblick über die Ernährungssituation einer Larvenkohorte zu erhalten. Bei einer hohen individuellen Variabilität der Trypsinaktivität kann auf eine hohe Dichte von geeigneten Futterorganismen und aktuell fressende Larven geschlossen werden. Bei geringen individuellen Unterschieden ist umgekehrt eine geringe Futterdichte anzunehmen. Diese aus Laborexperimenten abgeleiteten Rückschlüsse sind aber noch unter einem natürlichen Futterangebot zu verifizieren, das in der Regel nicht, wie bei Laborexperimenten meistens üblich, aus einer Monokultur sondern aus einem Gemisch von verschiedenen Nahrungsorganismen besteht. Van der Meeren (1991) berichtet in diesem Zusammenhang von der Selektion Nahrungsauswahl bei Steinbuttlarven und ist der Meinung, dass ein Gemisch von unterschiedlich grossen Nahrungsorganismen die unterschiedliche Entwicklungsgeschwindigkeiten der Larven innerhalb einer Kohorte besser berücksichtigt, da die Larven sich das jeweilige, zu ihrer Grösse optimal passende Nahrungsspektrum selbst wählen können. Dies kommt der natürlichen Situation sehr nahe und könnte die individuellen Trypsinaktivitätsschwankungen verringern.

Temperatur

Die Temperaturverhältnisse während der larvalen Phase von Fischlarven haben einen erheblichen Einfluss auf den larvalen Metabolismus mit signifikanten Folgen für die Wachstums- und Mortalitätsraten (z.B. Houde 1989, Buckley et al. 1993). Es ist deshalb denkbar, dass auch die Trypsinaktivität temperaturabhängige Effekte zeigt und damit Konsequenzen für die Bestimmung des Ernährungszustandes in Feldproben verbunden sind. Dies kann zum einen zu nicht vergleichbaren Trypsinaktivitäten bei Feldproben einer Art aus unterschiedlichen Gebieten führen, wenn die Fischlarven unter verschiedenen Temperaturbedingungen aufgewachsen sind, zum anderen könnte die Abnahme der Trypsinaktivität unter Hungerbedingungen bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich schnell verlaufen. Die Ermittlung von Temperatureffekten ist daher ein wichtiger Punkt für die Übertragbarkeit von Laborergebnissen auf Feldstudien. Bei der Prüfung des Temperatureinflusses auf andere biochemische Indikatoren zur Bestimmung des Ernährungszustandes von Fischlarven fanden Goolish et al. (1984) sowie Buckley (1984) deutliche Hinweise auf einen innerartlichen Temperatureffekt beim RNA/DNA-Verhältnis, der rechnerisch berücksichtigt werden

musste. Zu beachten sind ferner mögliche Unterschiede der Trypsinaktivität zwischen verschiedenen Arten, deren natürliche Lebensräume sich hinsichtlich der Wassertemperatur deutlich unterscheiden. Clemmesen (1992) vermutet einen grundsätzlichen Unterschied beim RNA/DNA-Verhältnis bei Fischlarven von Arten aus tropischen Meeresgebieten im Vergleich zu den Larven von Fischarten, die in gemässigten Breiten vorkommen. Damit ist beispielsweise die Übertragbarkeit von Laborkalibrierungen einer Art aus gemässigten Breiten auf eine tropische Art nicht möglich.

Der Vergleich der maximalen Trypsinaktivitäten von einer in subtropischen Breiten vorkommenden clupeiformen Fischart, der brasilianischen Sardine (*Sardinella brasiliensis*), mit den Trypsinaktivitäten von Heringslarven (*Clupea harengus* L.) hingegen zeigt keine bedeutsamen Unterschiede. Die Trypsinaktivitäten der Sardinienlarven unterscheiden sich in ihrer Amplitude nicht wesentlich von denen der entsprechend alten Heringslarven, eine ebenfalls clupeiforme und damit nahe verwandte Art. Bei Untersuchungen der Trypsinaktivität an den Larven verschiedener Fischarten aus dem tropischen Bereich des indischen Ozeans (zentrales arabisches Meer) war das Spektrum der Trypsinaktivitäten insgesamt vergleichbar mit jenen Verhältnissen, wie es bei den Arten, die aus gemässigten Breiten stammen, gefunden wurde (Sieg et al. 1989).

In der vorliegenden Studie konnten keine gezielten Versuche zum Temperatureinfluss durchgeführt werden, es standen jedoch die Daten aus jeweils zwei zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführten Herings- und Steinbuttlarvenaufzuchten zum Vergleich zur Verfügung. Zwischen diesen Aufzuchten konnten Unterschiede bei den Temperaturverhältnissen nicht vermieden werden. Der Vergleich der Temperaturen zeigt eine um bis zu 5°C (Heringslarven) bzw. um 3°C (Steinbuttlarven) unterschiedliche Temperatur in der Aufzuchtanlage während der Phasen I & II (Abb. 58a & b und Abb. 65a & b). Diese Phasen werden als besonders sensibel gegen Umwelteinflüsse und ungenügende Futterversorgung betrachtet (Pedersen 1993). Einer Erhöhung der Temperatur sollte nach der RGT-Regel bei ektothermen Organismen wie Fischlarven eine erhöhte Trypsinaktivität folgen und umgekehrt. Dieser Trend ist bei beiden Arten nicht erkennbar. Bei der Interpretation dieser Daten wurden jeweils vergleichbare und konstante Fütterungskonditionen vorausgesetzt, was sich aus der Wachstumsgeschwindigkeit bei den entsprechenden Kalibrierungsexperimenten zumindest für die Heringslarvenaufzuchten schliessen lässt. Aus den Beobachtungen lässt sich ableiten, dass der Vergleich des Ernährungszustandes von Larvenkohorten einer Art aus unterschiedlich temperierten Gebieten unter Verwendung der Trypsinaktivitäten (im Rahmen der natürlichen Schwankungsbreite) grundsätzlich nicht ausgeschlossen ist. In gezielten Laborstudien sollte aber der Einfluss der Temperatur auf die Trypsinaktivität noch genau quantifiziert werden.

Differenzierung zwischen hungernden und gefütterten Larven

Die Trypsinaktivitätsmessung hat sich bei den Laborexperimenten als sehr empfindliches Instrument für den Bestimmung der Fressaktivität von Fischlarven und als geeigneter Indikator für die Trennung von gefütterten und hungernden Fischlarven, mit Einschränkungen während der ersten 10 Lebenstage erwiesen. Die fehlende Trennschärfe zwischen hungernden und gefütterten Larven während der ersten 10 Tage ist kein analytisches Problem im Zusammenhang mit der verwendeten Messmethode, sondern lässt sich damit erklären, dass die Larven der untersuchten Arten nach dem Schlupf zunächst über einen mehr oder weniger grossen Dottervorrat verfügen. Untersuchungen zur Trypsinentwicklung in Heringslarven und Dorschlarven während der Dottersackphase mit Hilfe eines Radioimmunoassays kamen zu demselben Ergebnis (Pedersen et al. 1987, Hjelmeland et al. 1984, Pedersen 1993, Hjelmeland 1995). Auch bei der Anwendung anderer biochemischer Indikatoren waren während der ersten Tage nach dem Schlupf bis zum vollständigen Abbau des Dottervorrates keine Unterscheidung möglich. Martin & Wright (1987) berichten von fehlender Trennschärfe bei der Analyse der Fettsäuremuster bei theoretisch hungernden und bereits angefügerten Dottersacklarven von *Morone saxatilis*. O'Connell (1976) konnte auf histologischer Basis keinen Unterschied zwischen unterschiedlich ernährten Larven von *Engraulis mordax* während der gesamten Dottersackphase feststellen. Clemmesen (1992) fand bei Experimenten zum Ernährungszustand von Herings- und Steinbuttlarven keinen Unterschied im RNA/DNA-Verhältnis während der ersten 10 Tage nach dem Schlupf. Nach Aufzehrung des Dottervorrates ist schnell eine Unterscheidung der Ernährungsbedingungen mit Hilfe der Trypsinaktivität zwischen hoher und geringer (Steinbutt- und Heringslarven) Futterdichte sowie hungernden Larven möglich. Mit zunehmendem Alter bzw. zunehmender Grösse wird der Unterschied bei der Trypsinaktivität trotz der Variabilität bei gefütterten Larven immer deutlicher. In allen Fällen liessen sich die Trypsinaktivitäten der Hungergruppen über den gesamten beobachteten Zeitraum signifikant an eine Gerade anpassen wobei die Steigung der angepassten Geraden artenabhängig ist.

Um aus den Differenzen zwischen gut ernährten und hungernden Fischlarven aus der Laborkalibrierung auf den Ernährungszustand von Fischlarven in Feldproben zu schliessen, gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten: es kann ein Bereich definiert werden, der die Trypsinaktivitäten von gut ernährten Larven aus der Laborkalibrierung einschliesst oder es wird ein Grenzwert auf der Basis der unter Futterentzug gehaltenen Larven definiert. Die erste Möglichkeit wurde aufgrund der hohen Variabilität der Trypsinaktivitäten in den Futtergruppen verworfen. Trotz ausreichender Futterdichte wurden stets relativ hohe Mortalitätsraten beobachtet, und somit fanden sich auch in den Futtergruppen stets Larven deren Trypsinaktivitäten eher einem schlechten Ernährungszustand entsprachen. Unter diesen Voraussetzungen ist die Definition eines klaren Grenzwertes für gefütterte Larven zur Beurteilung des Ernährungszustandes von Fischlarven in Feldproben nicht möglich.

Als Beurteilungskriterium für schlecht ernährte oder hungernde Larven in Feldproben wurde deshalb jeweils der 95%-Vorhersagebereich der Regression ausgewählt, die an die Tryp-

sinaktivitäten von hungernden Larven in Relation zur Larvenlänge angepasst wurde. Alle Fischlarven mit einer auf dem oder unterhalb des oberen Grenzwertes liegenden Trypsinaktivität wurden als hungernd klassifiziert. Obwohl die Trypsinaktivität auf Futterentzug schnell reagiert, wurde bei den Laborversuchen beobachtet, dass eine signifikante Trennung z.B. zwischen hungernden und gefütterten Heringslarven in einigen Fällen erst nach einer mehr als 3 Tage dauernden Hungerphase möglich ist. Die Ursache für diese Beobachtung liegt zum einen in der Variabilität der Probenahme selber und zum anderen in der individuellen Variabilität der aus der Futtergruppe zufällig zum Hungern ausgewählten Larven. Die Beschränkung auf mindestens 4 Tage hungernde Heringslarven zur Bildung des Grenzwertes erhöht die Sicherheit bei der Abschätzung des Anteils hungernder Heringslarven in Feldproben und verhindert, dass nur vorübergehend schlechter ernährte Heringslarven als dauerhaft hungernd klassifiziert werden. Sinngemäß wurde so bei der Anwendung aller Kalibrierungen verfahren. Der Zeitrahmen in dem sich eine signifikante Trennung zwischen hungernden und gefütterten Larven erkennen lässt, ist artenabhängig und hängt neben abiotischen Faktoren auch von der Aktivität des Metabolismus ab. Bei einigen Arten wie dem Steinbutt ist eine signifikante Trennung in der Regel bereits nach ein bis zwei Tagen erkennbar.

Unter Verwendung dieses Indikators in Felduntersuchungen können verschiedene Fragen im Zusammenhang mit der Verhungierungshypothese untersucht werden. Die Empfindlichkeit des Indikators zum Nachweis der Fressaktivität ermöglicht Verhaltensstudien zur Ernährungsweise von Fischlarven oder Studien zum Fresserfolg unter verschiedenen hydrographischen Bedingungen, wie die Klärung der Frage, ob bestimmte Turbulenzen den Fresserfolg von Fischlarven verbessern, eine Frage, die ausführlich diskutiert wird (Rothschild & Osborn 1988, McKenzie & Leggett 1991) aber mangels geeigneter Messmethoden bisher in Felduntersuchungen nicht ausreichend geprüft werden konnte.

4.3 Trypsinaktivitätsbestimmung - Feldanwendungen

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse zur Abschätzung des Ernährungszustandes von Fischlarven verschiedener Arten aus Feldproben unter Anwendung des Indikators Trypsinaktivität diskutiert.

Heringslarven

Die untersuchten Heringslarven stammen aus produktionsbiologisch ganz unterschiedlich zu beurteilenden Gebieten. An einem Ende der Skala steht die Schlei, die als ein eutrophes Gewässer mit hoher Primärproduktion eingeschätzt werden kann (Nellen 1965, Lenz 1970, Schnack 1972, Stotz 1986). Durch den Landeinschluss dieses fördeähnlichen Seitenarms der westlichen Ostsee zusammen mit dem Eintrag von Nährstoffen durch die Landwirtschaft bei gleichzeitig geringem Wasseraustausch entsteht eine extreme Situation, wie sie eher für einen eutrophierten Binnensee typisch ist. Auch der Nord-Ostsee-Kanal gilt als sehr produktives Gewässer (Fiedler & Kils 1991). Das Hebriden und Orkney-Shetland Ge-

biet kann in einer mittleren Position mit immer noch ausreichend hoher Planktonproduktion eingeordnet werden (Nellen & Schadt 1992). In diesem Gebiet wurden Larven vom herbstlaichenden Buchan-Hering untersucht. Der englische Kanal wurde im Winter beprobt während der Laichzeit der Down-Heringe. Dieses Gebiet ist zu der Jahreszeit, in der die Probennahme durchgeführt wurde, als ein eher produktionsarmes Gebiet einzuordnen.

Zur Beurteilung des Ernährungszustandes konnte bei den Heringslarven eine Laborkalibrierung angewendet werden. Zur Abschätzung der Anzahl hungernder Larven wurde der 95%-Vorhersagebereich der an die Messwerte von 4-9 Tage hungernden Heringslarven angepassten linearen Regression herangezogen und längenbezogen mit den Verhältnissen in den Feldproben verglichen. Die Ergebnisse entsprachen bei den älteren Heringslarven weitgehend den angenommenen Verhältnissen in Bezug auf die theoretische Einschätzung der Produktion von Mikrozooplankton in den untersuchten Gebieten. Während in den Proben aus dem Hebriden- und Orkney-Shetland-Gebiet keine der über 10 mm langen Heringslarven als schlecht ernährt eingestuft wurden (Stat 703), waren es in den Proben im englischen Kanal 27.9% hungernde Heringslarven. Bei den anderen beiden Stationen in der nördlichen Nordsee wurden zwischen rund 37 und 80% schlecht ernährte Heringslarven festgestellt (Stat. 510 und 511). Diese Larven waren nach der Laboraufzucht zu urteilen etwa 10-12 Tage alt und befanden sich am Ende der Phase I im Übergang zur kritischen Phase II. Die geringen Trypsinaktivitäten, die einen schlechten Ernährungszustand indizieren, sind daher nicht unerwartet. Da aber im Zusammenhang mit diesen Untersuchungen keine Zooplanktondaten erhoben wurden, kann abschliessend nicht beurteilt werden, ob der relativ hohe Anteil hungernder Larven primär auf eine zu geringe Zooplanktondichte zurückzuführen ist. Der Unterschied zwischen Stat. 510 mit 80.2% und Stat. 511 mit 36.6% hungernden Larven bei gleichem Grössenspektrum lässt aber vermuten, dass Unterschiede in der Zooplanktonkonzentration die Ursache für die deutlich unterschiedlichen Anteile hungernder Larven war.

Bei den Proben aus dem Nord-Ostseekanal fiel die Verteilung der Larvengrößen über einen weiten Längenbereich auf, vergleichbar mit der Größenverteilung von Stat. 703. Es ist bekannt, dass die Heringslarven erst bei einer Grösse von etwa 30-40 mm in die offene Ostsee auswandern (Fiedler & Kils 1991). Dadurch vermischen sich im Kanal mehrere Altersgruppen und können um die Nahrungsressourcen konkurrieren. Dieser Umstand kann den relativ hohen Anteil hungernder Heringslarven in dieser Probe (21,6%), an dem auch grössere Larven beteiligt sind, erklären. Dieses Ergebnis ist unerwartet, da der Nord-Ostsee-Kanal eher als planktonreiches Gewässer eingeschätzt wird (Fiedler & Kils 1991). Es zeigt aber, wenn auch nur exemplarisch, das unter bestimmten Umständen auch ältere Larven (hier zwischen 30 und 45 Tagen alt) noch verhungern können.

In den Proben aus der Schlei konnten bei der Einordnung der Trypsinaktivitäten in die Laborkalibrierung bei beiden Probennahmen keine hungernden Larven festgestellt werden. Bei der zweiten Probennahme nach einer Woche wurde bei den sehr grossen Larven eine

gegenüber der ersten Probennahme um etwa 50% verminderte Trypsinaktivität festgestellt, die wahrscheinlich auf ungünstigere Ernährungsbedingungen zurückzuführen ist. Die Verringerung der Zooplanktondichte könnte entweder auf eine dichteabhängige Nahrungskonkurrenz zurückzuführen und Folge eines Zusammenbruches der Copepodenpopulation von *Eurytemora affinis*, dem Hauptnahrungsorganismen der Heringslarven in der Schlei, sein (Schnack 1972) oder auf einer Verzögerung der natürlichen Sukzession beim Zooplankton (Lenz 1970) beruhen. Zum erstgenannten Punkt diskutieren Cushing & Horwood (1994) die Möglichkeit, dass Fischlarven ihre Futterressource selbst derart stark dezimieren, dass anschliessend eine kritische Ernährungssituation entstehen kann. Im Laborexperiment wurde bei den Larven aus der Schlei vom ersten Probennahmeterrin unter vollständigem Futterentzug nach 3 Tagen eine Abnahme der Trypsinaktivität auf etwa 20% des Ausgangswertes zum Zeitpunkt des Fanges festgestellt (Abb. 86). Die Heringslarven aus der zweiten Feldprobe hatten zum Zeitpunkt der Probennahme eine etwa um die Hälfte geringere Trypsinaktivität, was sich unter Berücksichtigung des beschriebenen Experiments mit Larven aus der ersten Probennahme (Abb. 86) auf geringere Futterdichten zurückführen lässt. Unter der Annahme, dass der Rückgang nicht auf eine endogene Ursache (z.B. Krankheiten) zurückzuführen ist, zeigt dieser Vergleich, dass sich die Ernährungsbedingungen in der Schlei innerhalb einer Woche zwar verschlechtert, jedoch keinen für die Larven kritischen Zustand erreicht hatten.

Exemplarische Altersbestimmungen über die Otholithenanalyse bei einigen Heringslarven von der ersten Probennahme ergaben, dass diese Larven mit einer mittleren Länge von 24.15 mm etwa 45 bis 48 Tage alt waren (Ndomahina 1988). Die Heringslarven aus der Laboraufzucht waren bei einer vergleichbaren Länge bereits 60-65 Tage alt. Dies zeigt, dass die Heringslarven in der Schlei nach dem Schlupf generell eine sehr gute Nahrungssituation vorgefunden haben. Dieser Vergleich bestätigt das schon vorher erwähnte Phänomen, dass Fischlarven aus natürlichen Verhältnissen, die Verfügbarkeit von Futter vorausgesetzt, in der Regel ein schnelleres Wachstum zeigen als im Labor aufgezogene Larven derselben Art (McGurk 1984). Das schnellere Wachstum drückt sich hier nicht nur in der grösseren Länge bei gleichem Alter sondern auch in den höheren absoluten Werten der Trypsinaktivität beim Vergleich gleichgrosser Larven aus. So wie in diesem Fall wurden bei den Fischlarven aus anderen Feldproben häufig noch weit höhere Werte gemessen als für vergleichbar grosse, im Labor aufgezogene, gefütterte Larven.

Die Larven aus der Schlei können aufgrund ihrer Grösse zum Zeitpunkt der Probennahme in das Ende der Phase III eingeordnet werden. In dieser Phase verfügen Heringslarven über ein hohes Hungerpotential. Die aus der Schlei entnommenen Larven, die unter Futterentzug im Labor gehalten wurden (Abb. 86a & b), hatten auch nach 13 bzw. 12 Tagen den Grenzwert für hungernde Heringslarven entsprechenden Alters aus der Laborkalibrierung noch nicht unterschritten. Dieses Experiment bestätigt die Hypothese, dass die Trypsinaktivität unter andauernden Hungerbedingungen exponentiell abnimmt (vergl. Einleitung,

Abb. 3). Bei der Diskussion der Laborkalibrierungen wurde postuliert, dass eine hohe individuelle Streuung für einen höheren Anteil fressaktiver Larven in einer Probe spricht. In den Verhungerungsexperimenten mit den Heringslarven aus der Schlei sind die individuellen Streuungen bei den hungrigen Larven bereits in der ersten Probe nach Futterentzug deutlich geringer als bei den Feldproben zu Beginn des Experiments (Abb. 86a & b). Dieses Ergebnis bestätigt die Annahme, dass über die individuelle Variabilität der Trypsinaktivität in einer Feldprobe bereits Aussagen zur aktuellen Ernährungssituation und der Fressaktivität einer Larvenkohorte getroffen werden können.

Bei einer Variante der Versuche mit lebend aus der Schlei entnommenen und im Labor gehaltenen Heringslarven wurden diese zunächst mit den bei der Kalibrierung verwendeten Futterorganismen gefüttert (*Artemia*-Nauplien) und anschliessend unter Futterentzug gehalten. Dieses Experiment wurde zur Prüfung der Laborbedingungen, insbesondere den Fütterungskonditionen, an natürlich aufgewachsenen Heringslarven durchgeführt. Das Ergebnis war zunächst unerwartet: trotz hoher Futterdichte wurde nach 4 Tagen Fütterung eine deutliche Abnahme der Trypsinaktivität beobachtet mit geringer individueller Variabilität, wie sie typisch für hungrige Heringslarven ist und wie sie auch bei den Hungerexperimenten mit Heringslarven aus der Schlei gefunden wurden. Als Ursache für diesen Verlauf wird der Stress angenommen, der durch das Fangen und die Umsetzung entstanden ist. Der Umgebungswechsel und das veränderte Futterangebot haben dazu geführt, dass diese Larven die Futterraufnahme eingestellt haben. Nach einer Eingewöhnungsphase wurden die *Artemia*-Nauplien akzeptiert, und in der nächsten Probe nach 7 Tagen Fütterung wurden mit der Feldprobe vergleichbare Trypsinaktivitäten gefunden, sie lagen aber immer noch unter dem Mittelwert, der bei der ersten Feldprobe aus der Schlei festgestellt wurde. Möglicherweise hatten die Larven den Umsetzungsstress zu diesem Zeitpunkt noch nicht ganz überwunden, daneben stellt die Fütterung mit *Artemia*-Nauplien nur eine suboptimale Futtersversorgung dar. Generell werden *Artemia*-Nauplien als ein dem Naturplankton nicht gleichwertiges Futter beurteilt (z.B. Watanabe et al. 1983, Witt et al. 1984, Støttrup & Attamadal 1992). Die Ergebnisse dieses Experiments sprechen dafür, dass Fischlarven empfindlich auf Stress reagieren was zur Einstellung der Futterraufnahme führen kann bzw. dass sich Stress über die Störung der Verdauungsphysiologie auf die Trypsinaktivität auswirkt. Damit könnte die Trypsinaktivität auch als Indikator dienen, um z.B. Stressfaktoren bei der Larvenaufzucht in der Aquakultur zu identifizieren.

Sprotte

Als Beispiel für die Anwendung der Trypsinaktivität zur Beurteilung des Ernährungszustandes von Fischlarven in einer grösseren, systematischen Feldstudie werden in dieser Arbeit Ergebnisse aus einem SARP⁸-Projekt diskutiert.

⁸ SARP = **S**ardine and **A**nchovy **R**ecruitment **P**rogram

In dieser Studie wurde unter anderem der Ernährungszustand von Sprottenlarven während einer gesamten Laichsaison untersucht und mit den wichtigsten verfügbaren abiotischen und biotischen Parametern während der larvalen Phase verglichen. Über die Berechnung des Geburtszeitraumes von überlebenden, juvenilen Sprotten im darauffolgenden Herbst, wurde versucht festzustellen, ob eine bestimmte Periode während der Laichzeit der Sprotten als besonders günstig für die Überlebensraten der Larvenstadien eingeschätzt werden kann. Anschliessend wurde geprüft, ob sich die Abschätzung der Anzahl hungernder Sprottenlarven in den jeweiligen Zeiträumen bei den Überlebensraten bemerkbar macht. Diese SARP-Studie folgte einem Konzept, wie es Methot (1983) in einer exemplarischen Arbeit über die Sterblichkeit und Überlebensraten bei Larven von *Engraulis mordax* vorgestellt hat. Methot korrelierte die Larvenproduktion mit der Anzahl überlebender juveniler Anchovies und den Umweltparametern zum Zeitpunkt der Larvenphase. Die grosse Bedeutung solcher Untersuchungen und der Bedarf zur Aufklärung der Rekrutierungsschwankungen waren der Anlass zum Entwurf des SARP-Programms, in dessen Rahmen auch die hier vorgestellte Studie über die Sprottenlarven durchgeführt wurde.

Da die Sprotten, wie auch der Hering, zu den clupeiformen Arten gehören, wurde für die Bewertung der Situation bei Sprottenlarven die Kalibrierung von Heringslarven herangezogen. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass hohe Larvenabundanzen nicht zwangsläufig zu einer hohen Anzahl überlebender Juvenilen führt. In diesem Zusammenhang wird kontrovers diskutiert, ob eine dichteabhängige Regulierung bei begrenzten Futterressourcen für die Mortalitätsraten in der Larvalphase von Fischlarven von Bedeutung sein kann (Houde 1987, Zusammenfassung in Heath 1992).

Aus den Rückberechnungen der Geburtsdaten der juvenilen Sprotten ergibt sich ein Zusammenhang zwischen den Überlebensrate juveniler Sprotten und dem Ernährungszustand im Larvenalter. Aus den Phasen mit einem hohen Anteil hungernder Larven wurden praktisch keine juvenile Sprotten gefunden. Aus den Zeiträumen mit relativ geringen Anzahlen hungernder Larven gingen dagegen hohe Anzahlen juveniler Sprotten hervor (siehe Abb. 90). Mit den hier präsentierten, im Rahmen einer SARP-Studie ermittelten Ergebnissen wird ein wichtiger Beitrag zu der Frage geleistet, mit welchen Methoden und Strategien eine verlässliche Vorhersage der zu erwartenden Rekruten eines Jahrgangs getroffen werden kann.

Dorsch und Sardine

Für Dorsch und Sardine konnten im Rahmen dieser Studie keine umfangreichen Feldstudien durchgeführt werden. Die Anwendung der Laborkalibrierung an Dorsch- und Sardinienlarven (*Sardinella brasiliensis*) auf einige Feldproben sind als beispielhafte Anwendungen der Trypsinaktivitätsmessung zu verstehen. Sie sollten zeigen, wie die im Laborversuch ermittelten Trypsinaktivitäten im Vergleich zu jenen aus Feldproben ermittelten

Werten einzuordnen sind und die Brauchbarkeit der Trypsinaktivität zur Abschätzung hungernder Larven für zwei weitere Arten belegen.

Neben einigen Dorschlarven, deren Trypsinaktivitäten unterhalb des Grenzwertes für hungernde Larven liegen, sind die Trypsinaktivitäten der übrigen, als gut ernährt geltenden Larven genau in der gleichen Größenordnung wie die Trypsinaktivitäten für gefütterte Larven im Laborexperiment (vergl. Abb. 67 & Abb. 88). Diese Konstellation ist ungewöhnlich, bei den übrigen in dieser Studie untersuchten Arten weist immer ein Teil der Fischlarven aus den Feldproben eine deutlich höhere Trypsinaktivitäten auf als gefütterte Laborlarven derselben Art. Dieses Ergebnis spricht für eine optimale Haltung und Fütterung der Dorschlarven und lässt sich mit der hochwertigen Anreicherung der Futterorganismen mit essentiellen Substanzen während der Aufzucht erklären (vergl. Kapitel 2.2.2.3).

Auch für die Sardinenlarven ergeben sich aus der Kalibrierung im Labor brauchbare Daten für die Feldanwendung. In diesem Fall liegen die höchsten im Feld ermittelten Trypsinaktivitäten wieder deutlich über den Werten für im Labor aufgezogenen, gut ernährten Sardinenlarven.

Die exemplarische Feldanwendung der Daten aus den Laborkalibrierungen für Dorsch und Sardine zeigt auch hier die Brauchbarkeit der Trypsinaktivität zur Feststellung des Anteils schlecht ernährter oder hungernder Larven in Feldproben. In beiden Beispielen wird unterstrichen, dass das Vorkommen von hungernden Larven unter natürlichen Bedingungen keine Ausnahme ist (vergl. Tab. 6) und bei entsprechenden Studien als Sterblichkeitsursache immer in Betracht gezogen werden muss.

Anwendung der Wolfsbarschkalibrierung auf Schellfischlarven aus Feldproben

Die Laborkalibrierungen zur Trypsinaktivität für eine bestimmte Art sind wegen artspezifischer Unterschiede nicht ohne weiteres auf Fischlarven anderer Arten aus Feldproben übertragbar. Um dieser Problematik zu begegnen, wird hier neben dem Vorschlag, einen generalisierten Faktors anzuwenden, eine weitere Möglichkeit zur Beurteilung des Ernährungszustandes von Fischlarven aus Feldproben, für die noch keine Laborkalibrierung vorliegt, diskutiert.

Diese Möglichkeit basiert auf der Idee, dass verschiedene Arten ein ähnliches physiologisches Muster zeigen, d.h., dass sich die Trypsinaktivität in Abhängigkeit von der Larvengröße sehr ähnlich entwickelt. Bei der Abschätzung des Ernährungszustandes von Sprottenlarven mit Hilfe der Laborkalibrierung von Heringslarven wurde bereits davon ausgegangen, dass beide clupeiformen Arten hinsichtlich der Entwicklung und des Verhaltens der Verdauungsenzymkapazität unter Verschiedenen Ernährungsbedingungen ähnlich einzuschätzen sind. In diesem Beispiel wurden auf empirischer Basis die Labordaten von Wolfsbarschlarven mit den Daten von Schellfischlarven aus Feldproben verglichen. Die Entwicklung der

Trypsinaktivität von gefütterten Wolfsbarschlarven in Relation zur Larvenlänge wurde mit dem Spektrum der Trypsinaktivität von Schellfischlarven aus den Feldproben verglichen. Für den vergleichbaren Grössenbereich gibt es eine grosse Schnittmenge von Individuen mit ähnlichen Trypsinaktivitäten (Schnittmenge der Ellipsen, die 95% aller individuellen Werte enthalten, Abb. 92). Bei einer sehr unterschiedlicher Entwicklung der Trypsinaktivitäten wäre die Schnittmenge der Ellipsen deutlich kleiner, bzw. es würde sich keine Schnittmenge ergeben. Der vorgeschlagene Ansatz ist vor allem sinnvoll, wenn keine Laborkalibrierung für jene Art zur Verfügung steht, bei der eine Abschätzung hungernder Fischlarven in Feldproben benötigt wird. Nach Prüfung der physiologischen Ähnlichkeiten bei der Entwicklung der proteolytischen Verdauungsenzymkapazität wie hier exemplarisch gezeigt, können so Laborkalibrierungen über die kalibrierte Art hinaus verwendet werden.

In diesem Beispiel wurden unter Verwendung der Laborkalibrierung vom Wolfsbarsch 8.9% der Schellfischlarven als hungernd eingestuft. Dieser Wert ist vor dem Hintergrund anderer zu dieser Feldstudie gehörender Daten (z.B. Darmfüllungsgrad) als sehr realistisch einzuschätzen (McKenzie et al. 1999).

Tagesrhythmik der Trypsinaktivität in Feldproben

Die tageszeitliche Abhängigkeit der Trypsinaktivität unter *in situ* Bedingungen konnte mit Hilfe von Driftstationen an Sprotten- und Sardinenlarven untersucht und mit den Laborergebnissen zur Tagesrhythmik verglichen werden.

Aus den Laborversuchen mit Fischlarven zur tageszeitlichen Rhythmik der Trypsinaktivitäten war zu erkennen, dass die Oszillationen der Enzymaktivitäten in engem Zusammenhang mit der Fressaktivität stehen. Solche Rhythmen sind für die Trypsinaktivität auch bei Copepoden nachgewiesen worden (Båmstedt 1988). Baars & Oosterhuis (1984) empfehlen, die tageszeitabhängige Fressaktivität von Copepoden mit Hilfe der Trypsinaktivität zu bestimmen. Untersuchungen von Båmstedt (1988) zeigten für adulte *Calanus finmarchicus* sowohl einen an Jahreszeiten gebundenen Rhythmus der Trypsinaktivität als auch ausgeprägte tageszeitabhängige Schwankungen der Trypsinaktivität in Übereinstimmung mit dem Grad der Darmfüllung der Copepoden. Dieser war im Tagesverlauf direkt mit der Trypsinaktivität korreliert. Båmstedt (1988) vermutet als langfristige (jahreszeitliche) Regelung der Enzymaktivität eine Speicherung von Enzymen in sogenannten B-Zellen im Epithel des Darmtrakts und erklärt die kurzfristige Regelung über die Produktion und Sezernierung von Trypsinogen.

Bei Fischlarven wurde unter Laborbedingungen im Durchschnitt eine zeitliche Verzögerung von etwa einer Stunde zwischen der Futteraufnahme und einem beginnenden Anstieg der Trypsinaktivität beobachtet. Bei der Anwendung der Trypsinaktivität als Indikator für den Ernährungszustand und der Fressaktivität in Feldproben ist es von grosser Bedeutung, die Dynamik der Trypsinaktivität im Tagesverlauf unter natürlichen Bedingungen zu kennen. In

dieser Studie wurde die Trypsinaktivität von Sprotten- und Sardinenlarven in den Proben von Driftstationen in einem Zeitraum von 24 - 48 Stunden verfolgt. In allen drei vergleichbaren Untersuchungen ist eine ausgeprägte Variabilität der Trypsinaktivität im Tagesverlauf zu erkennen. Sprottenlarven beispielsweise zeigen bei beiden Driftstationen ein Trypsinaktivitätsminimum während des Tages (Abb. 93 & Abb. 94). Ein geringes Trypsinaktivitätsniveau wurde bei den Laborexperimenten in dieser Studie unmittelbar vor und auch noch während der fressaktiven Phase festgestellt. Damit konnte mit Hilfe der Trypsinaktivitätsmessung bestätigt werden, dass visuell orientierte Arten wie Sprottenlarven vorwiegend in Abhängigkeit vom Tageslicht Nahrung aufnehmen. Die Trypsinaktivität ist somit ein geeigneter Indikator, das Fressverhalten bei den Larven von Arten zu untersuchen, über deren Tagesrhythmus noch nichts bekannt ist. Die Fangzeit von Feldproben ist vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse bei der Interpretation der Darminhaltsanalysen von Fischlarven unbedingt zu berücksichtigen.

Die Untersuchung der Trypsinaktivität bei Sardinenlarven (*Sardina pilchardus*) in Abhängigkeit von der Tageszeit während einer 48-Stunden Driftstation ergab ein sehr konstantes Muster, das sich mit einer Frequenz von 24 Stunden wiederholt, ein zufallsbedingtes Ergebnis ist damit unwahrscheinlich. Die höchsten Trypsinaktivitäten wurden nachts bis morgens bei den Sardinenlarven gefunden, deren Schwimmblasen zu einem hohen Prozentsatz gefüllt waren. Die periodische Füllung der Schwimmblase bei clupeiformen Fischlarven in der Dunkelheit ist ein bekanntes Phänomen, dessen Hintergründe noch nicht klar sind. Eine Erklärungsversuch ist der durch die Schwerelosigkeit erleichterte, passive Transport der Larven mit oberflächennahen Strömungen in andere Gebiete (Hoss et al. 1989). Hier wird eine andere Erklärung für dieses Verhalten angeboten: durch die Schwimmblasenfüllung wird ein neutraler Auftrieb und damit eine Schwebefähigkeit erreicht, dadurch brauchen die Larven keine Energie für Schwimmaktivitäten aufzuwenden und können die so eingesparte Energie zur Optimierung der Verdauung einsetzen. Diese Hypothese wird durch die hohen Trypsinaktivitäten gestützt, die bei den Sardinenlarven mit gefüllter Schwimmblase gefunden wurden. Ein weiterer Vorteil der Schwimmblasenfüllung ist der damit verbundene Aufenthalt in der oberflächennahen Wasserschicht, wo die Temperaturen in der Regel höher sind als in den tieferen Wasserkörpern, in denen sich diese Larven tagsüber aufhalten. So werden die Verdauungsprozesse der Larven durch die höheren Temperaturen auf der Basis der RGT-Regel optimiert, was wiederum zu einem schnelleren Wachstum führt. Diese Hypothese wird durch die Untersuchungen von Wurtsbaugh & Neverman (1988) gestützt, die das Tag-Nacht-Wanderungsverhalten von juvenilen *Cottus extensus* in einem See mit ausgeprägter Schichtung untersuchten. Diese Art ernährt sich tagsüber in Bodennähe und wandert nachts an die etwa 10°C wärmere Oberfläche. In einem Laborexperiment mit dieser Art wurde nachgewiesen, dass bei der Simulation des Wanderungsverhaltens in wärmeres Wasser nachts eine etwa 3fach höhere Zuwachsrate erzielt wurde gegenüber den Individuen, die bei einer konstant niedrigen Temperatur gehalten wurden. Dieses als "post-feeding thermotaxis" bezeichnete Verhalten kann wahrscheinlich auch auf andere ekto-

therme Organismen übertragen werden und ist ein gutes Beispiel für ein fein abgestimmtes Zusammenspiel mehrerer ökologischer und physiologischer Faktoren.

Die Oszillationen der Trypsinaktivität im Tagesverlauf bei Sprotte und Sardine kann als Folge einer periodischen Futteraufnahme verstanden werden. Wird die zeitliche Verzögerung der Trypsinsezernierung als Folge einer Nahrungsaufnahme berücksichtigt, so können mit Hilfe der Trypsinaktivität die Zeiten aktiver Futteraufnahme sehr genau identifiziert werden. Dieser methodische Ansatz ermöglicht bei Feldstudien eine Differenzierung ob ein bestimmter Grad der Darmfüllung auf die Tageszeit, die Futterdichte oder auf Verluste durch Fangstress zurückzuführen ist. Besonders durch den Fangstress verlieren Fischlarven mit gestrecktem Darmtrakt häufig einen grossen Teil des Darminhaltes, die traditionelle Methode der Analyse des Darminhaltes hat daher meistens nur qualitativen Wert. Die Trypsinaktivität wird dagegen durch den Fang kaum beeinflusst (Pedersen 1984, Pedersen & Hjelme-land 1988). Voraussetzung sind Kenntnisse über den täglichen Fressrhythmus der zu untersuchenden Art. Als Zeit besonders aktiver Futteraufnahme wird in den beschriebenen Beispielen die Dämmerung angenommen, da anschliessend, mit einer zeitlichen Verzögerung, die höchsten Trypsinaktivitäten gemessen wurden. Da das Fressverhalten und die artspezifischen endogenen Rhythmen und Verhaltensweisen zwischen den Arten unterschiedlich sein können (Manteifel et al. 1978), kann daraus kein generelles Verhalten für die Fresszeiten anderer Arten abgeleitet werden. Für die Larven der meisten Fischarten kann aber ein vergleichbarer Rhythmus angenommen werden, da sich Fischlarven hauptsächlich visuell orientieren.

4.4 Schlussbetrachtung

Diese Studie hat sich im wesentlichen mit der Frage beschäftigt, ob die Trypsinaktivität als Indikator geeignet ist, um Verhungern als Mortalitätsursache der frühen Jugendstadien von Fischen in Feldstudien nachzuweisen. Dazu wurde eine hochempfindliche und objektive biochemische Methode zum Nachweis aktivierten Trypsinogens entwickelt, die es gestattet die Trypsinaktivität in allen Altersstufen larvaler Fische präzise und reproduzierbar nachzuweisen. Die Ergebnisse aus den Laborexperimenten zeigen, dass die Variabilität der Trypsinaktivität hauptsächlich durch drei Parameter beeinflusst wird: die ontogenetisch gesteuerte Entwicklung der Trypsinkapazität, die tagesrhythmischen Schwankungen und die individuelle Variabilität. Die ontogenetische Entwicklung der Trypsinaktivität verläuft für alle Arten etwa nach demselben Schema, und ist damit in bestimmten Grenzen vorhersagbar. Erschwerend für eine Interpretation von Feldproben ergibt sich daraus dass die Trypsinkapazität nicht linear zunimmt, sondern in Übereinstimmung mit der Theorie zur saltatorischen Entwicklung bei Fischlarven in gegeneinander abgrenzbaren Phasen erfolgt (Balon 1985). Entscheidend für die Brauchbarkeit der Trypsinaktivität als Indikator zur Feststellung hungernder Larven in Feldproben ist hierbei aber, dass das Niveau der Trypsinaktivität in den einzelnen Phasen für gut ernährte Larven grundsätzlich über den Trypsinaktivitätswerten von gleichaltrigen bzw. gleichgrossen hungernden oder schlecht ernährten Larven liegt.

Eine weiterer Faktor für die Variabilität ist der tägliche Rhythmus der Trypsinaktivität, die in engem Bezug zur Futtermittelaufnahme steht. Die geringsten im Tagesverlauf erreichten Trypsinaktivitätswerte lagen bei den Untersuchungen in dieser Studie immer über der Trypsinaktivität von vergleichbaren hungrigen Larven. Damit wird der in der Einleitung vorgeschlagene hypothetische Verlauf der Trypsinaktivität unter Futter- und Hungerbedingungen bestätigt. Die tageszeitabhängige Variabilität kann genutzt werden, um z.B. die Zeiten aktiver Futtermittelaufnahme herauszufinden, ein wichtiges Kriterium für den Zeitpunkt der Probenahme in Feldstudien um den Darminhalt von Fischlarven nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ bewerten zu können (McKenzie et al. 1999). In der Aquakultur können Kenntnisse über die von Fischlarven bevorzugten Zeiten der Futtermittelaufnahme hilfreich sein, um Fütterungszeiten und Rationen zu optimieren. Da die tagesrhythmische Variabilität der Trypsinaktivität als artspezifisch angenommen werden kann, lässt sich der Verlauf für eine Art vorhersagen. Die Variabilität zwischen einzelnen Larven lässt sich dagegen nicht vorhersagen, sie wird durch ein individuelles Verhalten der Fischlarve geprägt und führt zu einer relativ grossen Schwankungsbreite der Trypsinaktivität innerhalb von Larvenkohorten, die unter gleichen Bedingungen aufgewachsen sind. Dies gilt im wesentlichen für gefütterte Larven. Die Reaktion der Trypsinaktivität auf verschiedene Parameter ist kein grundsätzlicher Nachteil und kann genutzt werden, um differenziert unterschiedliche Fragen hinsichtlich der Ernährungssituation von Fischlarven beantworten zu können.

Die schnelle Reaktion der Trypsinaktivität auf Veränderungen im Futterangebot ist unter bestimmten Umständen ein Vorteil dieses Indikators gegenüber langsam reagierenden Methoden zur Abschätzung des Ernährungszustandes von Fischlarven. Beginnende Veränderungen im Ernährungszustand können bereits entdeckt werden, bevor die Fischlarven, durch längeres Hungern geschwächt, Räubern zum Opfer fallen (Rice et al. 1987) oder in der Wassersäule aufgrund ihrer veränderten Schwebfähigkeit durch den Umbau der biochemischen Zusammensetzung (Guisande et al. 1998) und der Aufgabe der bei Fischlarven verbreiteten Vertikalwanderungen nicht mehr zusammen mit den gesunden Larven vorkommen. Eine weitere mögliche Anwendung ist die Prüfung der Hypothese, ob bestimmte hydrographische Konstellationen (Mikroturbulenzen) besonders günstige Ernährungsverhältnisse schaffen (McKenzie & Leggett 1991). Ein Nachteil der schnellen Reaktion der Trypsinaktivität ist die daraus entstehende Variabilität. Diese im individuellen Fressverhalten der Fischlarven begründete Variabilität kann die Interpretation der Ergebnisse aus Feldstudien erschweren.

Für viele wirtschaftlich wichtige Fischarten stehen noch keine Laborkalibrierungen der Trypsinaktivität zur Verfügung, und einige Arten können auch bis heute im Labor nicht aufgezogen werden. Für die Abschätzung des Anteils hungriger Larven dieser Arten in Feldstudien wurden verschiedene Möglichkeiten angeboten, die als Grundlage für weitere Experimente in dieser Richtung verstanden werden sollen.

Abschliessend betrachtet können die zu Beginn dieser Studie gestellten Fragen bezüglich der Trypsinaktivität als möglicher Indikator für den Ernährungszustand von Fischlarven als hinreichend beantwortet gelten: die Trypsinaktivität konnte bei Fischlarven verschiedener Arten in allen Altersstufen individuell gemessen werden. Ferner hat die Anwendung dieses Indikators auf Fischlarven verschiedener Arten zur Begutachtung des Ernährungszustandes zu schlüssigen Ergebnissen geführt und gezeigt, dass mit diesem Ansatz die Bedeutung des Verhungerns bei Fischlarven in Felduntersuchungen untersucht werden kann. Dabei muss die Abschätzung des Ernährungszustandes von Fischlarven in Feldproben grundsätzlich über die an hungernde Laborlarven angepasste Kalibrierung erfolgen. Dies geht auf das Phänomen zurück, dass die bei den Larven in Feldproben anzutreffenden hohen Trypsinaktivitäten bei der Aufzucht derselben Art auch unter scheinbar optimalen Futterbedingungen in der Regel im Labor nicht erreicht werden können. Die Ursache liegt wahrscheinlich vor allem in den einseitigen und nicht optimalen Ernährungsbedingungen bei der Laboraufzucht. Die Abschätzung des Ernährungszustandes über die Werte von gefütterten Laborlarven würde so zu Fehleinschätzungen führen. Auch bei der Anwendung anderer Indikatoren zur Bestimmung des Wachstums und der Kondition von Fischlarven, wie beispielsweise dem RNA/DNA-Verhältnis, wird über diese Problematik berichtet (Clemmesen 1992).

Die aus dieser Studie hervorgehenden Kenntnisse über die Trypsinaktivität als Mass für den Ernährungszustand und die Fressaktivität von Fischlarven sind ausreichend, um diesen Indikator in Feldstudien gezielt und systematisch einsetzen zu können um zu prüfen, ob Verhungern eine wesentliche Ursache für die hohen und schwankenden Mortalitätsraten bei Fischlarven sein kann.

Weiterführende Arbeiten sollten sich vor allem mit der Laborkalibrierung von wirtschaftlich wichtigen Fischarten beschäftigen. Dabei sollten die vorgeschlagenen methodischen Verbesserungen berücksichtigt werden. Die regelmässige Anwendung von Trypsinaktivitätsmessungen in Feldstudien als Ergänzung zu den üblichen Routinemethoden könnte bald zu besseren Kenntnissen über die Zusammenhänge von Larvensterblichkeit und Rekrutierungsschwankungen führen und damit eine wertvolle Hilfe bei der Vorhersagbarkeit von zukünftig zu erwartenden Fischbestandsdichten sein.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, einen Beitrag zur Aufklärung der Ursachen für die starken jährlichen Schwankungen bei der Rekrutierung der marinen Nutzfischbestände zu leisten. Zur Untersuchung der Frage, ob massenhaftes Verhungern von Fischlarven eine wesentliche Ursache für die Rekrutierungsschwankungen ist, wurde geprüft, ob sich die Trypsinaktivität als Indikator eignet um den Ernährungszustand und die Fressaktivität von Fischlarven individuell und in allen Altersstufen darzustellen.

Hierzu wurde auf der Basis konventioneller photometrischer Methoden eine hochempfindliche fluoreszenzphotometrische Technik zur Bestimmung der Trypsinaktivität in Fischlarven entwickelt mit einer im Vergleich zu den bis dahin benutzten Verfahren etwa 100fach höheren Empfindlichkeit. Diese Methodenentwicklung stellte einen wesentlichen und wichtigen Bestandteil dieser Arbeit dar, da die individuelle Bestimmung der Trypsinaktivität Voraussetzung zur Untersuchung der in dieser Studie gestellten Fragen war.

Um artspezifische Unterschiede der Trypsinaktivität herauszufinden, wurden die Larven von 6 verschiedenen marinen Fischarten (Hering, Steinbutt, Dorsch, Wolfsbarsch, Goldbrasse, und brasilianische Sardine) aus sehr unterschiedlichen klimatischen Habitaten im Labor unter kontrollierten abiotischen Bedingungen aufgezogen und mit Rotatorien (*Brachionus plicatilis*) und *Artemia*-Nauplien in verschiedenen Dichten gefüttert.

Die wichtigsten Ergebnisse aus den **Laborversuchen** lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Als Bezugsgrößen für die Trypsinaktivität wurden das Larvenalter und die Larvenlänge gewählt. Bereits in der Dottersackphase konnte bei allen Arten eine Trypsinaktivität festgestellt werden. Sie nimmt mit dem Alter bzw. der Larvenlänge nicht gleichmässig zu, sondern folgt bei kontinuierlich gefütterten Larven einem ontogenetisch vorgegebenen Muster, mit insgesamt deutlich ansteigendem Verlauf bis zum Zeitpunkt der Entwicklung eines funktionsfähigen Magens. Dieses Muster spiegelt sich auch in der Wachstumsgeschwindigkeit wieder. Die Trypsinaktivität hat quantitativ betrachtet eine artspezifische Komponente. Steinbuttlarven zeigen die höchste, Heringslarven die geringste Trypsinaktivität bei vergleichbarem Alter. Der Anteil exogener Trypsinaktivität aus aufgenommener Nahrung spielt bei der Gesamttrypsinaktivität einer Larve eine nur untergeordnete Rolle.
- Die Trypsinaktivität reagiert sehr differenziert auf eine Veränderung der Futterdichte. Für Herings- und Steinbuttlarven wurde gezeigt, dass nicht nur gefütterte von hungernden Larven unterschieden werden können, sondern auch eine Unterscheidung zwischen gut und schlecht ernährten Larven möglich ist. Die Unterschiede zwischen hungernden und

gefütterten Gruppen sind in der Regel signifikant ist, während die Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Futterdichten nicht in allen Fällen signifikant sind.

- Bei hungrigen Larven ist die Trypsinkapazität bereits nach einigen Stunden geringer als bei gefütterten Larven, ein signifikanter Unterschied jedoch ist, in Abhängigkeit von der Art, erst nach 1-3 Tagen zu erkennen. Bei Arten aus den gemässigten Breiten dauert es länger bis ein signifikanter Unterschied sichtbar wird. Bei dauerhaftem Futterentzug nähert sich die Trypsinaktivität asymptotisch einem Grenzwert der in Abhängigkeit vom Alter bzw. der Larvengrösse unterschiedlich schnell erreicht wird und im Niveau artenspezifisch ist. Während der Dottersackphase und des Umstellungsprozesses von endogener auf exogene Nahrungsquellen besteht kein Unterschied bei der Trypsinaktivität von bereits mit Futter versorgten und hungrigen Larven bei allen untersuchten Arten. Diese Phase kann je nach Art bis zu 10 Tagen nach dem Schlupf andauern. Die individuelle Variabilität der Trypsinaktivität ist bei Futtergruppen hoch, sie nimmt bei geringer Nahrungsdichte ab und ist bei Hungergruppen mit zunehmender Hungerdauer kaum noch feststellbar.
- Es wurde eine tagesrhythmische Änderung der Trypsinaktivität im Zusammenhang mit dem Zeitpunkt der Fütterung festgestellt. Die Trypsinaktivität steigt nach einer Futterration im Bereich von Stunden deutlich an, und fällt ebenso schnell zurück auf das Niveau vor der Fütterung. Dieses basale Trypsinniveau gut ernährter Larven liegt immer deutlich oberhalb des Trypsinaktivitätsniveaus von mehreren Tagen hungrigen Larven. Neben der Triggerung der Trypsinausschüttung durch Futteraufnahme wurden Hinweise auf einen tageszeitabhängigen endogenen Rhythmus gefunden. Hungernde Larven zeigen keine bedeutende Änderung der Trypsinaktivität im Tagesverlauf.
- Für die Abschätzung hungriger Fischlarven in Feldproben wurde die Laborkalibrierung für hungrige Larven der entsprechenden Art in Beziehung zur Larvenlänge gesetzt und an eine Regressionsgerade angepasst. Der obere 95%-Vorhersagebereich der Regression wurde als Grenzwert zur Beurteilung des Ernährungszustandes definiert. Die Larvenlänge wurde als Bezugspunkt verwendet, weil sie durch Futterentzug kaum beeinflusst wird und sich im Gegensatz zum Alter bei Fischlarven aus Feldproben leicht bestimmen lässt.
- Aufgrund der artspezifischen Ausprägung der Trypsinaktivität lassen sich Laborkalibrierungen für die Feldanwendung prinzipiell nur auf die Arten anwenden, für die eine Laborkalibrierung vorliegt. Da für viele wichtige Nutzfischbestände noch keine Laborkalibrierungen zur Verfügung stehen bzw. schwierig zu ermitteln sind, wurden verschiedene Möglichkeiten aufgezeigt und diskutiert, mit denen sich die Ergebnisse aus den bis jetzt vorliegenden Kalibrierungen verallgemeinern lassen: a) die Anwendung der Kalibrierung innerhalb nahe verwandter Arten (Hering und brasilianische Sardine = Clupeidae) wurde

demonstriert, b) Beurteilung von Feldproben über die Kalibrierungsdaten von einer physiologisch ähnlichen Art. Am Beispiel von Wolfsbarsch und Schellfisch wurde gezeigt, wie der Ernährungszustand von Schellfischlarven aus Feldproben mit Hilfe der Kalibrierungsdaten von Wolfsbarschlarven beurteilt werden kann, c) es wurde ein allgemeingültiges Verhältnis (Quotient) zwischen der Trypsinaktivität von gefütterten und hungernden Larven definiert und getestet, wobei die Quotienten für Dorsch, Goldbrasse, Sardine und Wolfsbarsch sehr ähnlich sind.

- aus den Ergebnissen der verschiedenen Laborexperimente mit Steinbuttlarven wurde abgeleitet, dass die Bestimmung der Trypsinaktivität zu einer Optimierung der Futterration und Fütterungszeit in der Aquakultur beitragen kann.
- Die in dieser Studie untersuchten Arten stammen aus sehr unterschiedlichen Lebensräumen (gemäßigt, mediterran, subtropisch, tropisch). Hinweise auf einen entscheidenden Einfluss der für den Lebensraum einer Art typischen Temperatur auf die Trypsinkapazität konnte nicht festgestellt werden. Arten, die der gleichen Familie angehören, wie der Hering und die brasilianische Sardine, die bei sehr unterschiedlichen Temperaturen aufgezogen wurden, zeigen sehr ähnliche Trypsinkapazitäten. Somit ist der Vergleich der Trypsinaktivitätsmessungen für eine Art aus verschiedenen Gebieten mit unterschiedlichen Wassertemperaturen möglich.

In z.T. exemplarischen Feldstudien zur Trypsinaktivität von Fischlarven aus Feldproben wurde gezeigt, wie der Ernährungszustand bei verschiedenen Arten (Hering, Dorsch, Sprotte, brasilianische Sardine und Schellfisch) untersucht und bewertet werden kann.

Die wichtigsten Ergebnisse aus den **Felduntersuchungen** lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Es wurde der Ernährungszustand bei Heringslarven aus 4 unterschiedlichen Laichgebieten (Schlei, Nord-Ostsee-Kanal, Hebriden-Orkney-Shetland-Gebiet und Englischer Kanal) auf der Basis der Laborkalibrierung für den Hering miteinander verglichen. In den Proben aus der Schlei wurden keine hungernden Larven gefunden. In den Proben aus dem Nord-Ostsee-Kanal fanden sich 21.6% hungernde Larven, wobei auch ältere Larven (30 bis 45 Tage alt) betroffen waren, hier wurde eine Nahrungskonkurrenz vermutet. Im Hebriden-Orkney-Shetland Gebiet wurden auf verschiedenen Stationen zwischen 0 und 80% hungernde Larven festgestellt, wobei hier nur Larven unter 10 mm betroffen waren. Im Englischen Kanal wurden 27.9% der Larven in den Proben als hungernde Larven eingestuft, hiervon waren Larven aller Längenbereiche betroffen. Insgesamt entsprach der Befund weitgehend den theoretisch zu erwartenden Ernährungsbedingungen in den verschiedenen Gebieten zum Zeitpunkt der Untersuchungen.

- Für Sprotten wurden die Ergebnisse von einer grösseren Feldstudie im Rahmen des SARP (Sardine-Anchovy-Recruitment-Program) Programms vorgestellt. In dieser Studie wurde der Ernährungszustand von Sprottenlarven während einer gesamten Laichsaison von Mai bis August verfolgt und später mit der Abundanz juveniler Sprotten im Untersuchungsgebiet verglichen. Die Bewertung der Trypsinaktivitäten bei den Sprottenlarven erfolgte auf der Basis der Laborkalibrierungen vom Hering, wobei zwischen 53.1% (im Mai) und 6.3% (Juli-August) hungernde Sprottenlarven festgestellt wurden. Hervorgehend aus den Perioden mit den geringsten Anteilen hungernder Larven (Juni und August) wurde die höchste Abundanz von juvenilen Sprotten im Herbst festgestellt. Die während der Larvenperiode festgestellten Zooplanktondichten entsprachen diesen Zusammenhängen.
- Für den Dorsch und die brasilianische Sardine wurden einige Feldproben exemplarisch ausgewertet. Hierzu standen Laborkalibrierungen der jeweiligen Art zur Verfügung. In diesen Feldproben wurden ebenfalls hungernde Larven ermittelt (30.8% von 5-9 mm langen Dorschlarven, 28.6% bei 5-13 mm langen Sardinenlarven), bei beiden Arten waren auch grössere Larven betroffen.
- Unter Anwendung der Kalibrierung von Wolfsbarschlarven wurde der Ernährungszustand von Schellfischlarven abgeschätzt, die aus einer Feldstudie über den Einfluss von Mikroturbulenzen auf die Ernährungssituation sowie den Tagesrhythmus bei der Futteraufnahme stammten. Wolfsbarsch und Schellfisch sind ein Beispiel für eine enge physiologische Verwandtschaft bei der ontogenetischen Entwicklung der larvalen Trypsinaktivität. Bei den Schellfischlarven wurden im Längenbereich von 6-15.5 mm 8.9% der Larven als hungernd eingestuft, wobei auch hier grössere Individuen unter den hungernden zu finden waren.
- Untersuchungen über die Tagesrhythmik der Trypsinaktivität in Feldproben von Driftstationen zeigen bei Sprotten- und Sardinenlarven (*Sardina pilchardus*) einen regelmässigen Tag-Nacht-Rhythmus, der aufgrund der Laborexperimente mit der Fressaktivität in Verbindung gebracht werden konnte. Geringe Trypsinaktivitäten wurden in den Nachmittags- bis frühen Abendstunden gefunden, hohe Trypsinaktivitäten wurden zwischen Mitternacht und der Morgendämmerung gemessen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse aus den Felduntersuchungen, dass Verhungern eine grosse Bedeutung für die Gesamtmortalität von Fischlarven haben kann. Die Verhungershypothese kann somit im erweiterten Sinne (nach den Erkenntnissen dieser Studie sind regelmässig auch grössere Larven durch Verhungern bedroht) bestätigt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Alderdice D.F., Velsen F.P.J., 1971: Some effects of salinity and temperature on early development of Pacific herring. J. Fish. Res. Bd. Can.. 28. U. 1545-1562S
- Alliot E., Pastoreaud A. & Trelli J., 1977: Evolution of enzymatic activities in the digestive system during the sea-bass larval life (*Dicentrarchus labrax* L.). Variations of proteinograms and of zymograms. 3rd Meeting of the ICES-Working Group on Mariculture, Brest, France, may 1977. CNEXO, Brest, Okt 77, 85-91.
- Ásgeirsson B., Fox W.J. & Bjarnason B.J., 1989: Purification and characterization of trypsin from the poikilotherm *Gadus morhua* L.. Eur. J. Biochem., 180, 85-94.
- Baars M.A. & Oosterhuis S.S., 1984: Diurnal rhythms in grazing on labelled food, gut fluorescence and digestive enzyme activities of North Sea copepods. Neth. J. Sea. Res. 18: 97-119.
- Bahrs P., 1981: Wirkung verschiedener Fungizide auf die Entwicklung von Fischeiern. Diplomarbeit, Universität Kiel.
- Bailey K.M., 1984: Comparison of laboratory rates of predation on five species of marine fish larvae by three planktonic invertebrates: effects of larval size on vulnerability. Mar. Biol., 79, 303-309.
- Bailey K.M. & Stehr, C.L., 1986: Laboratory studies on the early life history of the walleye pollock, *Theragra chalcogramma* (Pallas). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 99, 233-246.
- Bailey K.M., & Houde, E.D., 1989: Predation on eggs and larvae of marine fish and the recruitment problem. Adv. Mar. Biol. 25, 1-83.
- Bailey K.M., Brodeur R.D., Merati N. & Yoklavich M.M., 1993: Predation on walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) eggs and yolk-sac larvae by pelagic crustacean invertebrates in the western Gulf of Alaska. Fish. Oceanogr. 2, 30-39.
- Bailey, K.M., Canino M.F., Napp, J.M., Spring, S.M. & Brown A.L., 1995: Contrasting years of prey levels, feeding conditions and mortality of larval walleye pollock *Theragra chalcogramma* in the western Gulf of Alaska. Mar. Ecol. Prog.Ser. 71, 207-218.
- Balon, E.K., 1985: The theory of saltatory ontogeny and life history models revisited. In: Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives. Balon E.K. (ed). Developments in environmental biology of fishes 5. Dr W. Junk Publishers., Dordrecht, 13-28.
- Båmstedt U., 1988: Interspecific, seasonal and diel variations in zooplankton trypsin and amylase activities in Kosterfjorden, western Sweden. Mar. Ecol. Prog. Ser. 44, 15-24.
- Baragi V. & Lovell R.T., 1986: Digestive enzyme activities in striped bass from first feeding through larva development. Trans. Am. Fish. Soc., 115, (3), 478-484.
- Barnabé, G., Boulineu-Coatanea F. & René F, 1976: Chronologie de la morphogenèse chez le loup ou bar *Dicentrarchus labrax* (L.) (Pisces, *Serranidae*) obtenu par reproduction artificielle. Aquaculture 8, 351-363.
- Bergeron J.P. & Person-Le Ruyet J., 1997: Teneur en ADN de la larve de *Dicentrarchus labrax*, L: évolution ontogénétique et effet de la privation de nourriture. Aquatic Living Resources, 10, 247-250.

- Bergeron, J.P., 1997: Nucleic acids in ichthyoplankton ecology: a review, with emphasis on recent advances for new perspectives. *Journ. of Fish Biol.*, 51, 284-302.
- Bergmeyer H.U., 1977: Grundlagen der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 260 S.
- Bergmeyer H.U., 1983: Methoden der enzymatischen Analyse. 3. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. Mehrbändig, wird ständig ergänzt.
- Bjarnason, J.B.; Maentylae, E.O. & Ásgeirsson B., 1993: Purification and characterization of proteolytic digestive enzymes from the pyloric caeca of Atlantic cod. In: Physiology and biochemical aspects of fish development. Walther B.T., Fyhn H.J. (eds.) Bergen Univ. Norway, 240-246.
- Blaxter J.H.S., Hempel G., 1961: Biologische Beobachtungen bei der Aufzucht von Heringsbrut. *Helgoländer wiss. Meeresuntersuchungen*, 7, 260-283.
- Blaxter, J.H.S. & Ehrlich K.F., 1974: Changes in behaviour during starvation of herring and plaice larvae. In: Blaxter, J.H.S. (ed.). Early life history of fish. Springer Verlag, Heidelberg-Berlin, 575-588.
- Blaxter J.H.S., 1981: The rearing of larval fish. In: Aquarium systems (ed. A.D. Hawkins), 303-323. Academic Press, London.
- Blaxter J.H.S. & Hunter J.R., 1982: The biology of the clupeoid fishes. In: Blaxter J.H.S. Russel F.S., Yonge M. (eds): Advances in marine biology 20, S. 194.
- Blaxter J.H.S. 1988: Pattern and variety in development. In: Hoar W.S. & Randall D.J., (eds.) Fish Physiology, Vol. XIA. Academic Press, San Diego, 1-58.
- BMFT-Jahresbericht, 1985: Projekt Nr. MFE 05223.
- Booman, C., Folkvord A. & Hunter J.R., 1991: Responsiveness of starved northern anchovy *Engraulis mordax* larvae to predatory attacks by adult anchovy. *Fish. Bull.* 89, 707-711.
- Brandhorst W., 1956: Über Laichen und Aufwuchs des Frühjahrsherings im Nord-Ostsee-Kanal. *Kieler Meeresforsch.* 12, 186-199.
- Brandt K., 1886: Das Vordringen mariner Thiere in den Kaiser Wilhelm-Kanal. *Zoologisches Jahrbuch. Abtheilung für Systematik, Geographie und Biologie der Thiere*, 387-408.
- Broudeur R.D. & Bailey K.M., 1996: Predation on the early life stages of marine fish: A case study on walleye pollock in the Gulf of Alaska. Proceedings of an International Workshop: Survival strategies in early life stages of marine resources. Watanabe Y., Yamashita Y., Oozeki Y. (eds.). Brookfield, VT-USA A.A. Balkema Publishers, 245-259.
- Buckley L.J., 1979: Relationship between RNA-DANN ratio, prey density and growth rate in Atlantic cod *Gadus morhua* L.. *Journ. of the Fish. Res. Board of Can.*, 36, 1497-1502.
- Buckley L.J., 1980: Changes in the ribonucleic acid, deoxyribonucleid acid, and protein content during ontogenesis in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, and the effect of starvation. *Fish. Bull. U.S.* 77, 703-708.
- Buckley L.J., 1984: RNA/DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Mar. Biol.* 80, 291-298.
- Buckley L.J., Smigielski A.S., Halavik T.A., Burns B.R. & Laurence G.C., 1993: Growth and survival of three temperate marine fish species at discrete prey densities. II. Cod (*Gadus morhua* L.), winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and silver hake (*Merluccius bilinearis*). In:

- Physiological and biochemical aspects of fish development, Walther B.T. & Fyhn H.J. (eds), University of Bergen, 184-195.
- Butler J.L., 1991: Mortality and recruitment of Pacific sardine, *Sardinops sagax caerulea*, larvae in the California current. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48, 1713-1723.
- Cahu C.L., Zambonino Infante J.L., Le Gall M.M. & Quazuguel P., 1995: Early weaning of seabass: are digestive enzymes limiting? In: Lavens P., Sorgeloos P., Jaspers E. & Ollevier F. (eds.), Larvi'95 - Fish and shellfish larviculture symposium. European Aquaculture Society, Ghent, Belgium, Spec. Publ. 24, 268-271.
- Cahu C.L. & Zambonino Infante J.L., 1997: Is the digestive capacity of marine fish larvae sufficient for compound diet feeding? Aquaculture 5, 151-160.
- Clemmesen C. 1987: Laboratory studies on RNA/DNA ratios of starved and fed herring (*Clupea harengus* L.) and turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. J. Cons. Int. Explor. Mer, 43, 122-128.
- Clemmesen C., 1988: A RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. Meeresforsch. 32, 134-143.
- Clemmesen-Bockelmann C., 1992: Das RNA/DNA-Verhältnis als Indikator für den Ernährungszustand von Fischlarven. Dissertation an der Universität Hamburg.
- Clemmesen C., 1996: Importance and limits of RNA/DNA ratios as a measure of nutritional condition in fish larvae. Proceedings of an International Workshop: Survival strategies in early life stages of marine resources. Watanabe, Y.; Yamashita, Y.; Oozeki, Y. (eds.). Brookfield, VT-USA A.A. Balkema Publishers, 67-82.
- Clemmesen C., Sanchez R. & Wongtschowski C., 1997: A regional comparison of the nutritional condition of SW Atlantic anchovy larvae, *Engraulis anchoita*, based on RNA/DNA ratios. Arch. Fish. Mar. Res. 45 (1), 17-43.
- Cousin J.C.B. & Laurencien F.B., 1985: Morphogenese de l'appareil digestif et de la vessie gazeuse du turbot, *Scophthalmus maximus* L. Aquaculture 47, 305-319.
- Coves D., Dewavrin G., Breuil G. & Devauchelle, 1991: Culture of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). In: CRC Handbook of Mariculture. Boca Raton, Florida, USA: 3-21.
- Cowan J.H. & Houde E.D., 1992: Size-dependent predation on marine fish larvae by ctenophores, scyphomedusae, and planktivorous fish. Fish. Oceanogr. 1, 113-126.
- Cushing D.H., 1975: Marine ecology and fisheries. Cambridge Univ. Press S. 278.
- Cushing D.H., 1984: The gadoid outburst in the North Sea. In: Journal de Conseil. Conseil International pour l'Exploration de la Mer 41, 159-166.
- Cushing D.H. & Horwood J.W., 1994: The growth and death of fish larvae. J. Plankt. Res. 16, 291-300.
- Dabrowski K., 1982: Proteolytic enzyme activity decline in starving fish alevins and larvae. Env. Biol. of Fishes, 7 (1), 73-76.
- Dabrowski K. & Culver D., 1991: The physiology of larval fish. Digestive tract and formulation of starter diets. Aquaculture Magazine, 49-61.
- De Lafontaine Y., & Leggett W.C., 1988: Predation by jellyfish on larval fish: an experimental evaluation employing *in situ* enclosures. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45, 1173-1190.

- DeMott W.R., 1989: Optimal foraging theory as a predictor of chemically mediated food selection by suspension-feeding copepods. *Limnol. Oceanogr.*, 34, 140-154.
- Ehrlich K.F., 1974: Chemical changes during growth and starvation of herring larvae. In: Blaxter J.H.S. (ed). *The early life history of fish*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 301-323.
- Ehrlich K.F., 1975: A preliminary study of the chemical composition of sea-caught larval herring and plaice. *Comp. Biochem. Physiol.* 51 B, 25-28.
- Ehrlich K.F., Blaxter J.H.S. & Pemperton R., 1976: Morphological and histological changes during growth and starvation of herring and plaice larvae. *Mar. Biol.* 35, 105-118.
- Ellertsen B., Moksness E., Solemdal P., Tilseth S., Westgard T., & Oiestad V., 1981: Growth and survival of cod larvae in an enclosure. Experiments and a mathematics model. *Rapp. P.-v. Reun. Cons. Int. Explor. Mer* 178, 45-57.
- Ellertsen B., Fossum P., Solemdal P., & Sundby S., 1989: Relation between temperature and survival of eggs and first-feeding larvae of northeast Arctic cod (*Gadus morhua* L.). *Rapp. P.-v. Réun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer*, 191, 209-219.
- Erlanger B.F. Kokowsky N. & Cohen, W., 1961: The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, 95, 271-278.
- EU-Projekt MA 1.96, 1994: Cooperative studies on the processes controlling recruitment of clupeiform fish. Final Report, 71 S.
- FAO, 1994: Review of the state of world marine fishery resources: marine fisheries, *FAO Fisheries Circular*, No. 920, Rome, FAO, 173 S.
- Ferron A. & Leggett W.C., 1994: An appraisal of condition measures for marine fish larvae. *Adv. in Mar. Biol.*, 30, 217-303.
- Fiedler M. & Kils U., 1991: Fischereibiologische Untersuchungen im Nord-Ostsee-Kanal. Gutachten im Auftrag des Wasser- und Schifffahrtsamtes Kiel-Holtenau, des Landessportfischerverbandes Schleswig-Holstein und des Ministers für Ernährung, Landwirtschaft, Forsten und Fischerei Schleswig-Holstein, 1-392
- Frank K.T. & Leggett W.C., 1985: Reciprocal oscillations in densities of larval fish and potential predators: a reflection of present and past predation? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42, 1841-1849.
- Fraser A.J., Sargent J.R., Gamble J.C. & MacLachlan P., 1987: Lipid class and fatty acid composition as indicators of the nutritional condition of larval Atlantic herring. *Am. Soc. Symp.*, 2, 129-143.
- Fricker A., 1969: Enzymatische Veränderungen in tiefgefrorenen Lebensmitteln. In: Zöllner N. (ed.) *Enzyme und Ernährung*, 63-72.
- Fuiman L.A. & Gamble J.C., 1988: Predation by Atlantic herring, sprat and sand-eels on herring larvae in large enclosures. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 44, 1-6.
- Fuiman L.A., 1989: Vulnerability of Atlantic herring larvae to predation by yearling herring. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51: 291-299.
- Gadomski D.M. & Petersen J.H., 1988: Effects of food deprivation on the larvae of two flatfishes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 44, 103-111.
- Gamble J.C. & Hay S.J., 1989: Predation by the scyphomedusan *Aurelia aurita* on herring larvae in large enclosures: Effects of predator size and prey starvation. *The-Early-Life-History-of-Fish.-*

- The Third ICES-Symposium, Bergen, 3.-5. October 1988. Blaxter, J.H.S., Gamble J.C., Westernhagen J.von, eds. 1989. vol. 191, 366-375.
- Gatten R.R., Sargent J.R. & Gamble J.C., 1983: Diet-induced changes in fatty acid composition of herring larvae reared in enclosed ecosystems. Journ. of the Mar. Biol. Assoc. Of the United Kingdom, 63, 575-584.
- Glazer G. & Steer, M.L., 1977: Requirements for activation of trypsinogen and chymotrypsinogen in rabbit pancreatic juice. Anal. Biochem. 77, 130-140.
- Gleeson M. & Maughan R.J., 1986: A simple enzymatic fluorometric method for the determination of triglycerides in 10µl of serum. Clinica Chimica Acta 156, 97-103.
- Goolish E.M., Barron M.G. & Adelman I.R., 1984: Thermoacclimatory response of nucleic acid and protein content of carp muscle tissue: influence of growth rate and relationship to glycine uptake by scales. Can. J. Zool. 62, 2164-2170.
- Govoni J.J, Boehlert G.W. & Watanabe Y., 1986: The physiology of digestion in fish larvae. Env. Biol. of Fishes, 16 (1-3), 59-77.
- Grave H., 1981: Food and feeding of mackerel larvae and early juveniles in the North Sea. Rapp. P.-v. Réun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer 178, 454-459.
- Grendell J.H., Tseng H.C. & Rothman S.S., 1984: Regulation of digestion. I. Effects of glucose and lysine on pancreatic secretion. Am. J. Physiol. 246 (Gastrointest. Liver Physiol. 9), G445-G450.
- Guilbault G.G., 1973: Practical fluorescence. Marcel Dekker, New York.
- Guisande C., Rivieiro I., Solá A. & Valdés L., 1998: Effect of biotic and abiotic factors on the biochemical composition of wild eggs and larvae of several fish species. Mar. Ecol. Prog. ser. 163, 53-61.
- Håkanson J.L., 1989b: Condition of larval anchovy (*Engraulis mordax*) in the Southern California Bight, as measured through lipid analyses. Mar. Biol., 102, 153-159.
- Håkanson J.L., 1993: Nutritional condition and growth rate of anchovy larvae (*Engraulis mordax*) in the California Current: Two contrasting years. Mar. Biol 115 (2), 309-316.
- Harris R.K., Nishiyama T. & Paul J., 1986: Carbon, nitrogen and caloric content of eggs, larvae and juveniles of the walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. Journal of Fish Biology, 29, 87-98.
- Harris R.P., Samain J.-F., Moal J., Martin-Jézéquel V., Poulet S.A., 1986: Effects of algal diet on digestive enzyme activity in *Calanus helgolandicus*. Mar. Biol. 90, 353-361.
- Hassett R.P., 1994: Digestive enzyme activity is present in mature copepods despite the absence of the corresponding substrates in the diet during development. J. Plankton Res., 16, 413-420.
- Heath, M., 1989: A modelling and field study of grazing by herring larvae. Rapp. P.-v. Réun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer, 191, 233-247.
- Heath, M.R., 1992: Field investigations of the early life stages of marine fish. Adv. mar. Biol. 28, 1-174.
- Hewitt, R.P., Theilacker G.H., & Lo N.C.H., 1985: Causes of mortality in jack mackerel. Mar. Ecol. Prog. Ser. 26, 1-10.
- Hirche, H.-J., 1981: Digestive enzymes of copepodids and adults of *Calanus finmarchicus* and *C. helgolandicus* in relation to particulate matter. Kieler Meeresforsch., Sonderh. 5, 174-185.

- Hjelmeland K. & Raa J., 1982: Characteristics of two trypsin type isozymes isolated from the arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 71B (4), 557-562.
- Hjelmeland K., 1983: Proteinase inhibitors in the muscle and serum of cod (*Gadus morhua* L.) Isolation and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 76 B, 365-372.
- Hjelmeland K., Huse I., Jørgensen T., Molvik G. & Raa J., 1984: Trypsin and trypsinogen as indices of growth and survival potential of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. In: E. Dahl, D.S. Danielssen, E. Moksness and P. Solemdal (eds.). *The propagation of cod, Gadus morhua* L., Part 1. Institute of Marine Research, Flødevigen Biological Station: 189-211.
- Hjelmeland K. & Jørgensen T., 1985: Evaluation of radioimmunoassay as a method to quantify trypsin and trypsinogen in fish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 114, 619-621.
- Hjelmeland K., Pedersen B.H., Nilssen E.M., 1988: Trypsin content in herring larvae, *Clupea harengus* L., ingesting inert polystyrene spheres or live crustacea prey. *Mar. Biol.* 98, 331-335.
- Hjelmeland K., 1995: Trypsin in fish: Studies of the enzyme and its inhibitors in the digestive system and epidermis of fish. *Diss. Norwegian College of Fishery Science. University of Tromsø, Norway.*
- Hjort J., 1914: Fluctuations in the great fisheries of northern Europe viewed in the light of biological research. *Rapp. P.-v. Réun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer* 20, 1-228.
- Hjort J., 1926: Fluctuations in the year classes of important food fishes. *J. Cons. Int. Explor. Mer* 1, 5-38.
- Hofer R. & Koeck G., 1989: Method for quantitative determination of digestive enzymes in fish larvae. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 36, (4), 439-441.
- Houde, E.D., 1987: Fish early life dynamics and recruitment variability. *Am. Fish. Soc. Symp.* 2, 17-29.
- Houde, E.D., 1989a: Comparative growth, mortality and energetics of marine fish larvae: temperature and implied latitudinal effects. *Fish. Bull. U.S.* 87 (3), 471-495.
- Houde, E.D., 1989b: Subtleties and episodes in the early life of fishes. *J. Fish. Biol.* 35 (Suppl. A), 29-38.
- Hunter J.R., 1981: Feeding ecology and predation of marine fish larvae. In: Lasker, (ed.): *Marine fish larvae. Morphology, ecology, and relation to fisheries.* Univ. of Wash. Press., Seattle, 33-73.
- ICES CM 1997: Report of the herring assessment working group for the area south of 62°N. ICES CM 1997/ASSESS:8.
- Kanaoka Y., Takahashi T., Nakayama H., Takada K., Kimura T., Sakakibara S., 1977: Synthesis of key fluorogenic amide, L-arginine-4-methyl-coumarinyl-7-amide (L-Arg-MCA) and its derivatives. Fluorescence assays for trypsin and papain. *Chem. Pharm. Bull.* 25, 3126-3128.
- Karlson P., 1984: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler.* 12. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Kawai S. & Ikeda S., 1973b: Studies on the digestive enzymes of fishes. IV: Development of the digestive enzymes of carp and black seabream after hatching. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 39, 877-881.

- Kils U., 1987: Verhaltensphysiologische Untersuchungen an pelagischen Schwärmen - Schwarmbildung als Strategie zur Orientierung in Umwelt-Gradienten - Bedeutung der Schwarmbildung in der Aquakultur, Ber. Inst. Meereskd., Kiel, S. 163.
- Kjørboe T., Munk P. & Richardson K., 1987: Respiration and growth of larval herring *Clupea harengus* L.: Relation between specific dynamic action and growth efficiency. Mar. Ecol. Prog. Ser., 40, 1-10.
- Kjørboe T., 1989: Growth in fish larvae. Are they particular efficient? Rapp. P.-v. Réun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer, 191, 383-389.
- Kolkovski S., Tandler A., Kissil W. & Gertler A., 1993: The effect of dietary exogenous digestive enzymes on ingestion, assimilation, growth and survival of gilthead seabream (*Sparus aurata* L., Sparidae Linnaeus) larvae. Fish. Physiol. Biochem. 12, 203-209.
- Koslow J.A., 1996: Energetic and life-history patterns of deep-sea benthic, benthopelagic and seamount-associated fish, J. Fish.Biol. 49, Suppl. A: 54-74.
- Kotrschal K., Adam H., Brandstätter R., Junger H., Zaunreiter M. & Goldschmid A. 1990: Larval size constraints determine directional ontogenetic shifts in the visual system of teleosts. Z. Zool. Syst. Evol. Forsch. 28, 166-182.
- Kuhlmann D., Quantz G., Witt U., 1981: Rearing of turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) on cultured food organisms and postmetamorphosis growth on natural and artificial food. Aquaculture, 23, 183-196.
- Lauff M., 1983: Entwicklung der proteolytischen Verdauungsenzyme bei Fischen und die Bedeutung von Nahrungsenzymen. Dissertation, Universität Innsbruck.
- Lauff M. & Hofer R., 1984: Proteolytic enzymes in fish development and the importance of dietary enzymes. Aquaculture, 37, 335-346.
- Leggett W.C. & DeBlois E. 1994: Recruitment in marine fishes: is it regulated by starvation and predation in the egg and larval stages. Neth. J. Res. 32, 119-134.
- Lehninger A.L., 1977: Biochemistry, second edition. New York, Worth Publishers Inc., 217-248.
- Lenz, J, 1970: "Zooplankton": In: Rheinheimer G. (Hrsg.): Chemische, mikrobiologische und planktologische Untersuchungen in der Schlei im Hinblick auf deren Abwasserbelastung. Kieler Meeresforschung 26, 203-213.
- Lochmann S.E., Maillet G.L., Taggart T.C. & Frank T.K., 1996: Effect of gut contents and lipid degradation on condition measures in larval fish. Mar. Ecol. Prog. Ser., 134, 27-35.
- Löffler G., Petrides P.E., Weiss L. & Harper H.A., 1985: Physiologische Chemie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- Love R.M., 1970: The chemical biology of fishes. Vol. 1. Academic Press, London & New York.
- Manteifel B.P., Girsu I.I. & Pavlov D.S., 1978: On rhythms of fish behaviour. In: Rhythmic activity of fishes. Thorpe J.E. (ed.). Academic press, London, New York & San Francisco.
- Margulies D, 1993: Assessment of the nutritional condition of larval and early juvenile tuna and Spanish mackerel (Pisces: *Scombridae*) in the Panamá Bight. Mar. Biol. 115, 317-330.
- Martin F.D. & Wright D.A., 1987: Nutritional state analysis and its use in predicting striped bass recruitment: Laboratory Calibration. Am. Fish. Soc. Symp. 2, 109-114.

- May R.C., 1971: Effects of delayed feeding on larvae of the grunion, *Leuresthes tenuis*. Fish. Bull. U.S., 69 (2), 411-425.
- May R.C., 1974: Larval mortality in marine fishes and the critical period concept. In: Blaxter, J.H.S. (ed.): The early life history of fish. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 3-19.
- Mähr K., Grabner R., Hofer R. & Moser H., 1983: Histological and physiological development of the stomach of *Coregonus* sp.. Archiv Hydrobiol. 98 (3), 344-353.
- McElman J.F. & Balon E.K., 1985: Early ontogeny of walleye, *Stizostedion vitreum*, with steps of saltatory development. In: Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives. Balon E.K. (ed). Developments in environmental biology of fishes 5. Dr W. Junk Publishers, 92-131.
- McFazden I.R.B., Lowe D.M., & Coombs S.H., 1994: Histological changes in starved turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) quantified by digital image analysis. J. Fish. Biol., 44, 255-262.
- McGurk M.D., 1984: Effects of delayed feeding and temperature on the age of irreversible starvation and on the rates of growth and mortality of Pacific herring larvae. Mar. Biol. 84, 13-26.
- McGurk M.D., 1985: Multivariate analyses of morphometry and dry weight of Pacific herring larvae. Mar. Biol. 86, 1-11.
- McGurk M.D., Paul A.J., Coyle K.O., Ziemann D.A. & Haldorson L.J., 1993: Relationships between prey concentration and growth, condition and mortality of Pacific herring, *Clupea pallasii*, larvae in an Alaska subarctic embayment. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50, 163-180.
- McKenzie B. R. & Leggett W.C., 1991: Quantifying the contribution of small-scale turbulence to the encounter rates between larval fish and their zooplankton prey: Effects of wind and tide. Mar. Ecol. Prog. Ser. 73, 149-160.
- Mackenzie B.R., Ueberschär B., Basford D., Heath M., A. Gallego A., 1999: Diel variability of feeding activity in haddock larvae in the East Shetland area, North Sea. Mar.Biol., im Druck.
- Methot R.D., Jr, 1983: Seasonal variation in survival of larval northern anchovy, *Engraulis mordax*, estimated from the age distribution of juveniles. U.S. Nat. Mar. Fish. Serv. Bull. 81, 741-750.
- Michaelis L., & Menten M.L., 1913: Theorie der Enzymkinetik. Biochem. Zeitschr. 49, S. 333.
- Munilla-Moran R., Stark J.R. & Barbour A., 1990: The role of exogenous enzymes in digestion in cultured turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture 88, 337-350.
- Munk P., 1995: Prey size of gadoid fish larvae, their relation to larval size and type of prey. Ichthyoplankton-Ecology Fisheries-Society-of-the British-Isles, 50 S.
- Murakami K. & Noda M., 1981: Studies on proteinases from the digestive organs of sardine - I. Purification and characterization of three alkaline proteinases from the pyloric caeca. Biochem. Biophys. Acta 65B, 17-26.
- Ndomahina T., 1988: Light microscopic observations of fish larval otolith microstructure (their preparation, interpretation and application in growth studies). Dissertation, Universität Kiel.
- Nellen W., 1965: Neue Untersuchungen über den "Schleihering", eine lokale Brackwasserform von *Clupea harengus* L.. Ber. Dtsch. Wiss. Komm. Meeresforsch. 18, 163-193.
- Nellen W. 1986: A hypothesis on the fecundity of bony fish. Meeresforsch. 31, 75-89.
- Nellen W. & Schadt J., 1992: Year-to-year variability in the plankton community on the spawning ground of the Hebrides-Buchan herring. ICES mar Sci. Symp., 195, 361-387.

- Nolting M., 1997: Trypsinaktivität, Proteingehalt und Überlebensrate wachsender Larven des europäischen Wolfsbarsches (*Dicentrarchus labrax* L.) in Abhängigkeit von Lebendfutter und Trockenfuttermitteln. Diplomarbeit, Universität Kiel.
- Nolting M., Ueberschär B. & Rosenthal H., 1999: Trypsin activity and physiological aspects in larval rearing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) using live prey and compound diets. J. Appl. Ichthyol. 15, in press.
- O'Connell C.P., 1976: Histological criteria for diagnosing the starving condition in early post yolk-sac larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 25, 285-312.
- O'Connell C.P., 1980: Percentage of starving northern anchovy, *Engraulis mordax*, larvae in the sea as estimated by histological methods. Fish. Bull. US, 78, 475-489.
- Oozeki Y, Ishii T. & Hirano R., 1989: Histological study of the effects of starvation on reared and wild-caught larval stone flounder, *Kareius bicoloratus*. Mar. Biol. 100, 269-275.
- Oozeki Y. & Bailey K.M., 1995: Ontogenetic development of digestive enzyme activities in larval walleye pollock, *Theragra chalcogramma*. Mar. Biol. 122, 177-186.
- Osse J.W.M., 1990: Form changes in fish larvae in relation to changing demands of function. Neth. J. Zool. 40, 362-385.
- Pauly D., Christensen V., Dalsgaard J., Frøse R. & Torres F., Jr., 1998: Fishing down marine food webs, Science, Vol. 279, 860-863.
- Paine M.D. & Balon E.K., 1985: Early development of the northern logperch, *Percina caprodes semifasciata*, according to the theory of saltatory ontogeny. In: Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives. Balon E.K. (ed). Developments in environmental biology of fishes 5. Dr W. Junk Publishers, 132-149.
- Pedersen B.H., 1984: The intestinal evacuation rates of larval herring (*Clupea harengus* L.) predated on wild plankton. Dana 3, 21-30.
- Pedersen B. H., Nielssen E.M. and Hjelmeland K. 1987: Variations in the content of trypsin and trypsinogen in larval herring (*Clupea harengus* L.) digesting copepod nauplii. Mar. Biol. 94: 171-181.
- Pedersen B.H. & Hjelmeland K., 1988: Fate of trypsin and assimilation efficiency in larval herring (*Clupea harengus* L.) following digestion of copepods. Mar. Biol. 97, 467-476.
- Pedersen B.H., 1993: Protein Digestion in herring (*Clupea harengus* L.) larvae: Trypsinogen secretion and effects of a transitory food restriction on mortality, growth and digestive enzyme content. In: Physiological and biochemical aspects of fish development, Walther B.T. & Fyhn H.J. (eds), University of Bergen, 220-225.
- Pelletier D., Dutil J.-D., Blier P. & Guderley H., 1994: Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. Comp. Physiol. B 164, 179-190.
- Pepin P & Shears T.H., 1995: Influence of body size and alternate prey abundance on the risk of predation to fish larvae. Mar. Ecol. Prog. Ser. 128, 279-285.
- Perkin-Elmer (Bodenseewerk) (ed.) 1978: Einführung in die Fluoreszenz-Spektroskopie. Angewandte UV-Spektroskopie, Heft 4, Perkin-Elmer, Überlingen.

- Peterman R., Bradford M.J., Lo N.C.H. & Methot R.D., 1988: Contribution of early life stages to inter-annual variability in recruitment of northern anchovy (*Engraulis mordax*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45, 8-16.
- Plantikow H., Arndt G.-M, Tappenbeck L. & Schurno M., 1993: Investigations of the exocrine pancreas of teleosts: Trypsin activity and CCK/PZ content in the digestive tract of larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at first-feeding. In: Physiological and biochemical aspects of fish development, Walther B.T. & Fyhn H.J. (eds), University of Bergen, 216-219.
- Powell A.B. & Chester A.J., 1985: Morphometric indices of nutritional condition and sensitivity to starvation of spot larvae. Trans. Am. Fish. Soc., 114, 338-347.
- Rannak L.A. & Simm M.A., 1977: On the diurnal feeding rhythm of Baltic herring larvae in the Bay of Parnu. Rybokhoz. Issled. Bass. Balt. Morya 13, 88-99.
- Reichow D., Largadier C. Klingenberg CH., Clemmesen C., Fröse R. & Ueberschär B. 1991: The use of multivariate morphometrics to determine the nutritional condition of marine fish larvae. ICES-C.M./L:15, S. 5.
- Rice J.A., Crowder L.B. & Binkowski F.R., 1987: Evaluating potential sources of mortality for larval bloater (*Coregonus hoyi*): Starvation and vulnerability to predation. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 44, 467-472.
- Rooker R., Holt G.J. & Holt S.A., 1997: Condition of larval and juvenile red drum (*Sciaenops ocellatus*) from estuarine nursery habitats. Mar. Biol. 127, 387-394.
- Rosenthal H. & Alderdice D.F., 1976: Sublethal effects of environmental stressors, natural and pollutional, on marine fish eggs and larvae. J. Fish. Res. Bd. Can., 33, 2047-2065.
- Rothschild B.J., 1986: Dynamics of marine fish populations. Harvard University press, Cambridge, Mass., S. 277.
- Rothschild B.J. & Osborn T.R., 1988: Small-scale turbulence and plankton contact rates. J. Plankton Res. 10, 465-474.
- Sandholm M. & Scott M.L., 1979: Binding of lipase, amylase, and protease to intestinal epithelium as affected by carbohydrates and lectins in vitro. Acta vet. Scand. 20, 329-342.
- Sarasquete M.C., Polo A. & Gonzales de Canales, M.L., 1993: A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of the sea bream, *Sparus aurata* L. Histochem. J. 25, 430-437.
- Schadt J. 1986: Eine vergleichende Betrachtung der Planktonsituation auf den Laichplätzen des Downs- und Buchan- Herings während der Fortpflanzungszeit beider Bestände. Diplomarbeit, Universität Kiel, 146 S.
- Schnack D., 1972: Nahrungsökologische Untersuchungen an Heringslarven. Ber. Dt. Wiss. Komm. Meeresforsch. 22, 273-343.
- Schnack D., 1981: Studies on the mortality of Pacific herring larvae during their early development, using artificial *in situ* containments. Rapp. P. -v- Reun. Cons. Int. Explor. Mer., 178, 135-142.
- Schneemann B.O. & Lyman R.L., 1975: Factors involved in the intestinal feedback regulation of pancreatic enzyme secretion in the rat. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 148, 897-903.
- Segner H., Storch V., Reinecke M., Kloas W. & Hanke W., 1994: The development of functional digestive and metabolic organs in turbot, *Scophthalmus maximus* L.. Mar. Biol. 119, 471-486.

- Seiderer L.J., Davis C.L., Robb F.T. & Newell R.C., 1987: Digestive enzymes of the anchovy *Engraulis carpensis* in relation to diet. mar. Ecol. Prog. Ser. 35, 15-23.
- Setzler-Hamilton E.M., Wright D.A., Martin F.D., Millsaps C.V. & Whitlow S.I., 1987: Analysis of nutritional condition and its use in predicting striped bass recruitment: field studies. Amer. Fish. Soc. Symp. 2, 115-128.
- Shelbourne J.E., 1957: The feeding and condition of plaice larvae in good and bad plankton patches. Journ. Of the Mar. Biol. Ass. of the United Kingdom, 36, 539-558.
- Sieg, A., Clemmesen C. & Ueberschär B., 1989: Comparison of biochemical and histological methods for the evaluation of the *in situ* nutritional condition of marine fish larvae. ICES-C.M./L:4, 11 S.
- Sieg A., 1992a: Histological study of organogenesis in young stages of the mesopelagic fish *Vinciguerria* (Photichthyidae). Bull. Mar. Sci. 50 (1), 97-107.
- Sieg A., 1992b: A histological study on the nutritional condition of larval and metamorphosing fishes of the genus *Vinciguerria* (Photichthyidae) sampled in two contrasting environments. J. Appl. Ichthyol. 8, 154-163.
- Sieg A., 1995: Histologische Kriterien zur Erfassung unterschiedlicher Ernährungszustände bei frühen Lebensstadien der Südwestatlantischen Sardelle, *Engraulis anchoita* HUBBS & MARINI 1935, und das Auftreten verschieden ernährter Larven dieser Art in hydrographisch abweichenden Regionen ihres Rekrutierungsgebietes. Dissertation, Universität Hamburg, 149 S.
- Sissenwine M.P., 1984: Why do fish populations vary? In: R.M. May (ed.), Exploitation of marine communities. Springer Verlag, Berlin, 59-94.
- Skreslet S., 1989: Spatial match and mismatch between larvae of cod (*Gadus morhua* L.) and their principal prey, nauplii of *Calanus finmarchicus* (Gunnerus). Rapp. P.-v. Réun. Cons. Perm. Int. Explor. Mer, 191, 258-263.
- Støttrup J.G. & Attramadal Y., 1992: The influence of different rotifer and *Artemia* enrichment diets on growth, survival and pigmentation in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. Journ. World Aquacult. Soc. 23, 307-316.
- Stotz W., 1986: Das Makrobenthos der Schlei- Produktion und Bedeutung als Fischnahrung. Dissertation, Universität Kiel. 166 S.
- Tanaka M., 1969: Studies on the structure and function of the digestive system in teleost larvae. II: Characteristics of the digestive systems in larvae at the stage of first feeding. Jpn. J. Ichthyol. 16, 41-49.
- Theilacker G.H., 1978: Effect of starvation on the histological and morphological characteristics of jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, larvae. Fish. Bull. 76 (2), 403-414.
- Theilacker G.H., 1986: Starvation-induced mortality of young sea-caught jack mackerel *Trachurus symmetricus*, determined with histological and morphological methods. Fish. Bull. 87, 1-17.
- Theilacker G.H., Kimball A.S. & Trimmer J.S., 1986: Use of an ELISPOT immunoassay to detect euphausiid predation on larval anchovy. Mar. Ecol. Progr. Ser., 30, 127-131.
- Theilacker G.H., Chyan H. L. N., Townsend A.W., 1993: An immunochemical approach to quantifying predation by euphausiids on the early stages of anchovy. Mar. Ecol. Prog. Ser., 92, 35-50.
- Thorisson K, 1992: Is metamorphosis a critical stage in the early life of marine fishes? ICES C.M., L:37, 16 S.

- Tukey W., 1977: Exploration data analysis. Reading, Mass. Eddison-Westey Publication Company.
- Udenfriend S., 1969: Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Vol. 2. Academic Press, New York.
- Ueberschär B., 1985: Untersuchungen über die Verdauungsenzyme von Fischlarven. Diplomarbeit. Universität Kiel. 111 S.
- Ueberschär B., 1988: Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analyzing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. Meeresforsch., 32, 144-154.
- Ueberschär B., Pedersen B.H. & Hjelmeland K., 1992: Quantification of trypsin with a radioimmunoassay in herring larvae (*Clupea harengus* L.) compared with a highly sensitive fluorescence technique to determine tryptic enzyme activity. Mar. Biol. 113, 469-473.
- Ueberschär B., 1993: Measurement of proteolytic enzyme activity: significance and application in larval fish research. In: Physiological and biochemical aspects of fish development, Walther B.T. & Fyhn H.J. (eds), University of Bergen, 233-239.
- Ueberschär B., 1995: The use of tryptic enzyme activity measurement as a nutritional condition index: laboratory calibration data and field application. ICES Mar. Sci. Symp. 201, 119-129.
- Ugelstad I., Lein I., Hjelmeland K., 1995: Synthesis of the digestive enzyme trypsin in halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae and juveniles. In: Mass rearing of juvenile fish. Pittman K., Batty R.S., Verreth J.(eds.) ICES Mar. Sci. Symp. 201.
- Valentini H. & Cardoso R.D., 1992: Análise da pesca da sardinha-verdadeira (*Sardinella brasiliensis*) na costa sudeste-sul do Brasil. Atlântica, 13,(1), 45-54.
- Van der Meeren, T., 1991: Selective feeding and prediction of food consumption in turbot larvae (*Scophthalmus maximus* L.) reared on the rotifer *Brachionus plicatilis* and natural zooplankton. Aquaculture 93, 35-55.
- Van der Veer H.W. & Bergmann M.J.N., 1987: Predation by crustaceans on newly settled 0-group plaice *Pleuronectes platessa* population in the western Wadden Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 34, 203-215.
- Vega-Pérez L.A., 1996: In: Pires-Vanin, A.M.S. coord. Oceanografia da Plataforma Interna da Região de São Sebastião-Projeto OPISS, Vol. 1. Mimeo., 79-165.
- Vinas M.D. & Ramirez F.C. 1996: Gut analysis of first-feeding anchovy larvae from the Patagonian spawning areas in relation to food availability. Arch. Fish. Mar. Res. 43 (3), 231-256.
- Walford J. & Lam T.J., 1993: Development of digestive tract and proteolytic enzyme activity in seabass (*Lates calcarifer*) larvae and juveniles. Aquaculture 109, 187-205.
- Watanabe T., Tamiya T., Oka A., Hirata M., Kitajima C. & Fujita S., 1983: Improvement of dietary value of live foods for fish larvae by feeding them on n-3 highly unsaturated fatty acids and fat-soluble vitamins. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 49, 471-479.
- Watanabe Y, Zenitani H. & Kimura R., 1996: Causes of population decline in the Japanese sardine (*Sardinops melanosticus*): Overfishing or early mortality? Proceedings of an International Workshop: Survival strategies in early life stages of marine resources. Watanabe Y., Yamashita Y., Oozeki Y. (eds.). Brookfield, VT-USA A.A. Balkema Publishers, 83-94.
- Weber W., 1974: Heringsmarkierung in der Schlei. Inf. f. d. Fischwirtschaft, 21,149-50.

- Werner R.G. & Blaxter J.H.S., 1980: Growth and survival of herring larvae (*Clupea harengus* L.) in relation to prey density. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 37, 1063-1069.
- Wiebe P.H., Burt K.H., Boyd S.H. & Morton A.W., 1976: A multiple opening/closing net and environment sensing system for sampling zooplankton. J. Mar. Res., 34, 313-326.
- Witt U., Koske H.P., Kuhlmann D. Lenz J. & Nellen W., 1981: Production of *Nannochloris spec.* (Chlorophyceae) in large scale outdoor tanks and its use as food organisms in marine Aquaculture. Aquaculture 23, 171-181.
- Witt U., Quantz G. & Kuhlmann D., 1984: Survival and growth of turbot larvae *Scophthalmus maximus* L. reared on different food organisms with special regard to long-chain polyunsaturated fatty acids. Aquacultural Engineering 3, 177-190.
- Witting D.A. & Able K.W., 1995: Predation by sevenspine bay shrimp, *Crangon septemspinosa*, on winter flounder, *Pleuronectes americanus*, during settlement: laboratory observations. Mar. Ecol. Prog. Ser. 123, 23-31.
- Wurtsbaugh W.A. & Neverman D., 1988: Post-feeding thermotaxis and daily vertical migration in a larval fish. Nature 333, 846-847.
- Yamashita Y, Yamada H., Malloy K.D., Targett T.E., Tsuruta Y., 1996: Sand shrimp predation on settling and newly-settled stone flounder and its relationship to optimal nursery habitat selection in Sendai Bay, Japan. Proceedings of an International Workshop: Survival strategies in early life stages of marine resources. Watanabe Y., Yamashita Y., Oozeki Y. (eds.). Brookfield, VT-USA A.A. Balkema Publishers, 271-283..
- Yin M.C., Blaxter J.H.S., 1986: Morphological changes during growth and starvation of larval cod *Gadus morhua* and flounder *Platichthys flesus*. Journ. Of Exp. Mar. Biol. And Ecol., 104, 215-228.
- Yin C.M & Blaxter S.H.J., 1987: Feeding ability and survival during starvation of marine fish larvae reared in the laboratory. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 105, 77-83.
- Zambonino-Infante J.L.; Cahu C.L.; 1994: Development and response to a diet change of some digestive enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae. Fish. Physiol. Biochem. 12, 399-408.
- Zambonino-Infante J.L.; Cahu C.L.; Peres A.; Quazuguel P.; Gall M.M.L., 1996: Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae fed different Artemia rations: Growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. Aquaculture, 139 (no. 1-2), 129-138.
- Zar J.H., 1984: Biostatistical Analyses. Second Edition, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, N.J., 292-298.
- Zimmermann M., Ashe B., Yurewicz E.C. & Patel G., 1977: Sensitive assays for trypsin, elastase, and chymotrypsin using new fluorogenic substrates. Anal. Biochem. 78, 47-51.

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

- Abb. 1: Einflüsse und Prozesse, die die Bestandsdichte von Fischen auf dem Weg vom Ei über die Larve bis zum juvenilen Fisch bestimmen können (neu gezeichnet nach Houde 1987). Die grau gemusterte Ellipse bezeichnet den für diese Arbeit relevanten Lebensabschnitt. 8
- Abb. 2: Beispiele für die Verbreitung des proteolytischen Enzyms Trypsin in marinen Organismen (Fischlarven und Evertebraten). Die Trypsinaktivitäten sind als typische Werte für die untersuchten Organismen in der angegebenen Grösse zu verstehen. Alle Werte basieren auf Untersuchungen des Autors dieser Arbeit. 13
- Abb. 3: Hypothese zum Verhalten der Trypsinaktivität bei regelmässig gefütterten und hungernden Fischlarven. Während die Trypsinaktivität bei gefütterten Larven im Tagesverlauf auf einem hohen Niveau in Abhängigkeit von der Nahrungsration regelmässig oszilliert, nimmt die Trypsinaktivität in hungernden Fischlarven exponentiell ab, dieser Verlauf ist schematisierend in 3 Zustände (A,B und C) eingeteilt. 15
- Abb. 4: Trypsinaktivität als Indikator zur Bestimmung des Ernährungszustandes von Fischlarven aus Feldproben: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte von der Laborkalibrierung bis zur Feldanwendung. 16
- Abb. 5: Das Flussdiagramm zeigt im Überblick die einzelnen Schritte, die von der ganzen Larve bis zur Messung der Enzymaktivität am Fluoreszenzphotometer führen. 19
- Abb. 6: Das Prinzip der Trypsinaktivitätsbestimmung mit Hilfe einer hochempfindlichen, fluoreszenzphotometrischen Methode. Der Anstieg der Fluoreszenz pro Zeiteinheit ist proportional zur Trypsinmenge im Larvenhomogenat. 21
- Abb. 7: Der Verlauf der Temperaturgradienten nach Befüllung der Küvetten mit Homogenat und Substrat. Nach etwa 3 min. sind gleichmässige Temperaturverhältnisse in allen Küvetten erreicht und die Messung kann gestartet werden. 22
- Abb. 8: Eichung mit Standardtrypsin (32U mg^{-1} , SERVA). Die Messpunkte repräsentieren jeweils Mittelwerte von 5 Parallelmessungen (die Standardabweichung ist nicht sichtbar, da sie vernachlässigbar klein ist). Die Werte sind signifikant an eine lineare Regressionsgerade angepasst ($p < 0.05$). 25
- Abb. 9: Eichung mit gereinigtem Heringstrypsin. Die Messpunkte repräsentieren jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung von 3 Parallelmessungen. Die Werte sind signifikant an eine lineare Regressionsgerade angepasst ($p < 0.05$). Die flache Gerade zeigt die Restaktivitäten im Homogenat unter Einwirkung eines Trypsin-Inhibitors aus Hühnereiweiss. 25
- Abb. 10: Zunahme der Emission pro Zeiteinheit für zwei verschiedene Konzentrationen vom Standardtrypsin (8.3 und 5.5 ng ml^{-1}) über eine gesamte Messzeit von 16 min. Die Messpunkte wurden an eine lineare Regression angepasst. Die Fluoreszenzzunahme ist signifikant linear zur Zeit korreliert ($p < 0.05$). 26
- Abb. 11: Zunahme der Emission pro Zeiteinheit für Trypsin aus zwei verschiedene Heringslarven über einen Messzeitraum von 14 min. Die Messpunkte wurden an eine lineare Regression angepasst. Die Fluoreszenzzunahme ist signifikant linear mit der Zeit korreliert ($p < 0.05$). 27

- Abb. 12: Proportionalitätsmessung mit Steinbutthomogenat für Volumina von 10-300 μl pro Messung. Substrat CBZ-L-Arg-MCA. Die Messwerte sind jeweils Mittelwerte von 3 Parallelmessungen. Die Homogenatmengen sind linear proportional zur enzymatischen Aktivität. Die angepasste Regressionsgerade zeigt einen signifikant linearen Verlauf ($p < 0.05$)..... 28
- Abb. 13: Proportionalitätsmessung mit Herings- und Wolfsbarschlarvenhomogenat für Volumina von 10- 150 μl bzw. 10-100 μl pro Messung. Substrat CBZ-L-Arg-MCA. Die Messwerte sind jeweils Mittelwerte von 3 Parallelmessungen. Die Homogenatmengen sind linear proportional zur enzymatischen Aktivität. Die angepassten Regressionsgeraden zeigen einen signifikant linearen Verlauf ($p < 0.05$)..... 28
- Abb. 14: Eichkurve mit dem Fluorophor MCA im Konzentrationsbereich von 4.5-365 nMol. An die Messwerte wurde eine signifikant lineare Regression angepasst ($p < 0.05$). Der Ausschnitt zeigt den Bereich der in der Größenordnung der Konzentrationen liegt, der den Trypsinaktivitäten entspricht, wie sie bei den meisten Messungen in dieser Arbeit an Fischlarven festgestellt wurden (die Einheiten der Achsen sind identisch mit denen der grossen Abbildung). 29
- Abb. 15: Flussdiagramm zum methodischen Ablauf bei der Bestimmung der Verluste von enzymatischer Aktivität bei der Präparation der Fischlarvenhomogenate..... 31
- Abb. 16: Der Einfluss von 3 verschiedenen g-Beschleunigungen bei der Zentrifugation der Fischlarvenhomogenate auf die Ausbeute an enzymatischer Aktivität. 32
- Abb. 17: Schematischer Aufbau der Larvenhälterung am Beispiel eines 400l-Beckens. Die Wasserstandsregulierung im Becken erfolgte durch ein in der Länge variables Standrohr. Der Wasserzulauf war parallel zur Oberfläche verlegt und konnte individuell reguliert werden. Zur Ausleuchtung diente eine über dem Becken in etwa 50cm Höhe über dem Wasserspiegel hängende Leuchtstoffröhre. 39
- Abb. 18: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf als Mittelwert aus allen Versuchsbecken der Heringslarvenaufzucht 1986. Die Temperatur wurde täglich gemessen, der Salzgehalt wöchentlich bestimmt. Die kalendarische Zeitachse soll die Einordnung der Versuche in die Jahreszeit veranschaulichen..... 41
- Abb. 19: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf als Mittelwert aus allen Versuchsbecken der Heringslarvenaufzucht 1989. Die Temperatur wurde täglich gemessen, der Salzgehalt wöchentlich bestimmt. Die kalendarische Zeitachse soll die Einordnung der Versuche in die Jahreszeit veranschaulichen..... 42
- Abb. 20: Schematische Darstellung der Anordnung der Plexiglasrundbecken zur Produktion von Grünalgen (*Nannochloris spec.*) und Rotatorien (*Brachionus plicatilis*)...... 43
- Abb. 21: Probennahmeschema während der Heringslarvenaufzucht 1986. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste 46 Tage vom Schlupf bis zur letzten Probennahme. Die Abbildung gibt Auskunft über die Probenahmeterminale für die Futtergruppen und zeigt den Beginn (gepunktete Linien), die Dauer und die Probenahmeterminale für die Hungerintervalle. Alle Proben wurden vor der täglichen Futterzugabe entnommen. Die Zahlen (n) bezeichnen den Stichprobenumfang der jeweils analysierten Individuen. Zusätzlich sind die Futterbedingungen über den Versuchszeitraum skizziert..... 46

Abb. 22: Probennahmeschema während der Heringslarvenaufzucht 1989. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste 65 Tage vom Schlupf bis zur letzten Probennahme. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.....	46
Abb. 23: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf als Mittelwert aus allen Versuchsbecken während der Steinbuttlarvenaufzucht I+II 1986. Die Temperatur wurde täglich gemessen, der Salzgehalt wöchentlich bestimmt. Die kalendarische Zeitachse (oben) soll die Einordnung der Versuche in die Jahreszeit veranschaulichen, die unteren Skalen zeigen das Larvenalter.....	49
Abb. 24: Probennahmeschema während der Steinbuttlarvenaufzucht I, 1986. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste 30 Tage vom Schlupf bis zur letzten Probennahme. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.....	50
Abb. 25: Probennahmeschema während der Steinbuttlarvenaufzucht II, 1986. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste 32 Tage vom Schlupf bis zur letzten Probennahme. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.....	51
Abb. 26: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf bei der Dorschlarvenaufzucht 1994. Temperatur und Salzgehalt wurde, bis auf wenige Ausnahmen, täglich gemessen. Die kalendarische Zeitachse soll die Einordnung der Versuche in die Jahreszeit veranschaulichen.	53
Abb. 27: Probennahmeschema für die Dorschlarvenaufzucht 1994. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste 35 Tage vom Schlupf bis zur letzten Probennahme. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.....	54
Abb. 28: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf bei der Wolfsbarschlarvenaufzucht 1994. Temperatur und Salzgehalt wurden, bis auf wenige Ausnahmen, täglich gemessen. Die kalendarische Zeitachse veranschaulicht die Jahreszeit, zu der die Experimente durchgeführt wurden.	56
Abb. 29: Probennahmeschema für die Wolfsbarschlarvenaufzucht 1994. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste 40 Tage vom Schlupf bis zur letzten Probennahme. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.....	57
Abb. 30: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf bei der Goldbrassenlarvenaufzucht 1995. Temperatur und Salzgehalt wurden täglich gemessen. Die kalendarische Zeitachse veranschaulicht die Jahreszeit, zu der die Experimente durchgeführt wurden.	59
Abb. 31: Probennahmeschema für die Goldbrassenaufzucht 1995. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste vom Schlupf bis zur letzten Probennahme 19 Tage. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.....	60
Abb. 32: Temperatur- und Salzgehaltsverlauf bei der Sardinenlarvenaufzucht in Brasilien 1995. Temperatur und Salzgehalt wurden täglich bestimmt. Die kalendarische Zeitachse veranschaulicht die Jahreszeit, zu der die Experimente durchgeführt wurden.	62
Abb. 33: Probennahmeschema für die Sardinenlarvenaufzucht 1995 in Brasilien. Der gesamte Versuchszeitraum umfasste vom Schlupf bis zur letzten Probennahme 14 Tage. Erklärung der Abbildungselemente und Legenden siehe Abb. 21.....	63
Abb. 34: Geographische Lage und Logbuchnummern der für biochemische Untersuchungen befischten Stationen während der 132. Reise von F.S. "Poseidon" (Stat. 510, 511, 703) und der 146. Reise von F.S. "Anton Dohrn" (Stat. 98). Die Position im Nord-Ostseekanal ist ebenfalls vermerkt.	65

- Abb. 35: Geographische Lage des regelmässig beprobten Stationsnetzes im Zusammenhang mit einem EU-Projekt zur Untersuchung der Rekrutierungsprozesse bei clupeiformen Fischen. Der Ausgangspunkt der für diese Arbeit relevanten Driftstationen ist ebenfalls markiert. 67
- Abb. 36: "Spikeversuche" mit Steinbuttlarvenhomogenat. Bei Übereinstimmung der errechneten Kurve B aus A+C (Theorie) mit der gemessenen Kurve sind keine Verluste oder Zugewinne an enzymatischer Aktivität aufgetreten. Bei Abweichungen nach unten sind Verluste, bei Abweichungen nach oben Gewinne entstanden. Bei diesem Experiment sind keine signifikanten Unterschiede ($p < 0.05$) zur errechneten Kurve zu erkennen. Die Messwerte wurden jeweils an eine lineare Regression angepasst..... 71
- Abb. 37: "Spikeversuche" mit Homogenat von Heringslarven aus der Aufzucht. Erklärungen siehe Abb. 36..... 71
- Abb. 38: "Spikeversuche" mit Homogenat von Heringslarven aus Feldproben (Schlei). Erklärungen siehe Abb. 36..... 72
- Abb. 39: Zusammenhang zwischen Substratkonzentration und Umsetzungsgeschwindigkeit des Substrates CBZ-L-Arg-MCA mit Trypsin aus Fischlarvenhomogenaten (Herings- und Steinbuttlarven) und Trypsinstandard. Die Messungen wurden bei einem pH-Wert von 8.00 und einer Temperatur von 30°C durchgeführt. Die Messwerte wurden an Gleichungen zweiten Grades angepasst, die Anpassungen sind signifikant ($p < 0.05$). 73
- Abb. 40: Die Aktivität von Fischlarventrypsin in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert. Substrat: N α -Benzoyl-L-Arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid (L-BAPNA) bei 405 nm, neu gezeichnet nach Daten von Ueberschär (1985). 75
- Abb. 41: Der Einfluss der Inkubationstemperatur auf die enzymatische Aktivität von Standardtrypsin und Trypsin aus Fischlarvenhomogenat. Geprüft wurde in einem Temperaturbereich von 21° bis 42°C. Die kleine Abbildung zeigt den Einfluss der Temperatur auf die nicht-enzymatische Hydrolyse (Autohydrolyse) des Substrates CBZ-L-Arg-MCA (die Einheiten sind identisch mit denen der grossen Abbildung). Die Messpunkte sind Mittelwerte von 3 Parallelmessungen mit Standardabweichung. 75
- Abb. 42: Der Einfluss des pH-Wertes auf die enzymatische Aktivität von Standardtrypsin und Trypsin aus Fischlarvenhomogenat. Geprüft wurde bei pH-Werten von 6 - 10. Die kleine Abbildung zeigt den Einfluss des pH-Wertes auf die nicht-enzymatische Hydrolyse (Autohydrolyse) des Substrates CBZ-L-Arg-MCA (die Einheiten sind identisch mit denen der grossen Abbildung). Die Messpunkte sind Mittelwerte von 3 Parallelmessungen mit Standardabweichung. 76
- Abb. 43: Ein Vergleich zwischen der Messung der Trypsinaktivität mit der in dieser Arbeit entwickelten Analytik und der Quantität von Trypsin mittels eines Radioimmunoassays im Darmtrakt von 53 Tage alten Heringslarven aus der Aufzucht. Jedes Symbol repräsentiert den Messwert einer Fischlarve. Die hungernden Larven wurden vor der Probennahme 68 Stunden ohne Futter gehalten. Die Regressionsanalyse zeigt eine signifikant lineare Beziehung zwischen den Ergebnissen beider Messverfahren ($p < 0.05$) sowohl für gefütterte als auch für hungernde Heringslarven. 77

- Abb. 44: Die Beziehung zwischen der Nauplienanzahl (*Acartia tonsa*) im Darmtrakt von 53 Tage alten Heringslarven und der Trypsinaktivität respektive der Trypsinquantität. An die Daten wurden jeweils lineare Regressionen signifikant ($p < 0.05$) angepasst. 78
- Abb. 45: Die Beziehung zwischen der Anzahl von Copepodennauplien (*Acartia tonsa*) im Darmtrakt von Heringslarven zur direkt gemessenen Trypsinkonzentration über einen RIA und zur errechneten Trypsinkonzentration über den Enzymaktivitätsassay mit Hilfe einer Eichung mit gereinigtem Heringstrypsin. Die Symbole entsprechen individuellen Messungen an einzelnen Heringslarven. Der Vergleich der Regressionsgeraden zeigt einen parallelen Verlauf jedoch signifikante Unterschiede bei den Achsenabschnitten ($p < 0.05$). 79
- Abb. 46: Aus den Quotienten der Trypsinaktivität für gefütterte und hungernde Larven jeweils einer Art (in 0.2mm Intervallen) wurden Mittelwerte gebildet (die jeweiligen Faktoren der Arten) und als Tukey-Box-Plots dargestellt. Der Mittelwert für die Arten Hering und Steinbutt sind stark unterschiedlich von denen der übrigen Arten. 80
- Abb. 47: Veränderung des Quotienten aus der Trypsinaktivität für gefütterte und für hungernde Larven bei den in dieser Arbeit kalibrierten Arten mit zunehmender Länge. Je grösser der Unterschied zwischen den Trypsinaktivitätswerten von gefütterten und hungernden Larven ist, desto stärker steigt der Quotient positiv mit der Länge an und um so ausgeprägter ist die nach oben gerichtete Biegung der Bänder. 81
- Abb. 48: Unterschied in der Fluoreszenzausbeute beim Vergleich von normalen und verspiegelten Halbmikroküvetten. Getestet wurden ansteigende Konzentrationen des für die Erstellung von Eichkurven verwendeten Fluorophors MCA. 83
- Abb. 49: Unterschiede in der Fluoreszenzausbeute beim Vergleich von normalen und verspiegelten Halbmikroküvetten. Getestet wurde mit einem Trypsinstandard bei verschiedenen Konzentrationen. 84
- Abb. 50 a-c: Doppelt-Reziproke Darstellung der Michaelis-Menten Kinetik für die enzymkatalysierte Umsatzgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration und der Art des Substrates. Getestet wurden 2 verschiedene Substrate (CBZ-L-Arg-MCA und BZ-L-Arg-MCA bei pH 8.00 und 30°C) mit Trypsin aus a) Herings- und b) Steinbuttlarvenhomogenaten sowie c) ein Trypsinstandard (SERVA, 32U mg⁻¹). 86
- Abb. 51: Aktivierung von Trypsinogen mit verschiedenen Enterokinasekonzentrationen. Substrat CBZ-L-Arg-MCA, pH 8.00, Temperatur 30°C. Die Enterokinasekonzentration bezieht sich auf die Endkonzentration in der Küvette. Zum Vergleich wird das Verhalten des Trypsinogens und der Enterokinase in der höchsten hier eingesetzten Konzentration gezeigt. 87
- Abb. 52: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Heringslarven von der Aufzucht 1986 bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 7-15 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung vom Mittelwert. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls. Die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode in Tagen. 89
- Abb. 53: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Heringslarven (Hungerdauer 2-6 Tage) von der Aufzucht 1986 in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden jeweils in 0.5mm-Schritten errechnet (entsprechend der Genauigkeit bei der Längenmessung). An die

- Daten der hungernden Larven wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse eine Gerade mit dem Vertrauensbereich der Regression (95%) angepasst..... 90
- Abb. 54: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei den Heringslarven von der Aufzucht 1986. An die individuellen Wertepaare von Länge und Alter wurden bei gefütterten und hungernden Larven Regressionsgeraden angepasst (mit Vertrauensbereich für gefütterte Larven), die signifikant unterschiedlich sind ($p < 0.05$). Die gezeigten Messpunkte repräsentieren die Werte für gefütterte Larven, eine Markierung kann mehrere Larven mit denselben Wertepaaren vereinen (die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 53 vermerkt). Für hungernde Gruppen wird zur Erhaltung der Übersichtlichkeit nur die Regressionsgerade gezeigt. Die Residuen in der kleinen Abbildung verdeutlichen die Abweichungen der individuellen Werte von der Regressionsgeraden nach oben oder unten um eine Nulllinie..... 91
- Abb. 55: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei Heringslarven mit unterschiedlichen Fütterungskonditionen und hungernden Heringslarven von der Aufzucht 1989 bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 3-16 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen vom jeweiligen Mittelwert. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode in Tagen. 92
- Abb. 56: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei Heringslarven von der Aufzucht 1989 die mit hoher und geringer Futterdichte aufgezogen wurden sowie von hungernden Heringslarven (Hungerdauer 2-9 Tage) in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden jeweils in 0.5 mm-Schritten errechnet (entsprechend der Genauigkeit bei der Längenmessung). An die Daten der Hungergruppen wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse eine Gerade mit dem Vertrauensbereich (95%) angepasst. 92
- Abb. 57: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei den Heringslarven von der Aufzucht 1989. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 56 vermerkt. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54..... 93
- Abb. 58a & b: Erste (1986) und zweite (1989) Heringslarvenaufzucht. Vergleich der Trypsinaktivitäten (a) und des Temperaturverlaufs (b) während der beiden Aufzuchtversuche in Beziehung zum Larvenalter. 94
- Abb. 59: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei Steinbuttlarven von der ersten Aufzucht 1986 bei hoher und geringer Futterdichte sowie bei hungernden Steinbuttlarven bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 4-15 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode in Tagen. 95
- Abb. 60: Trypsinaktivitäten bei Steinbuttlarven von der ersten Aufzucht 1986, die bei hoher und geringer Futterdichte aufgezogen wurden, sowie von hungernden Steinbuttlarven (Hungerdauer 3-7 Tage) in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden in 0.5mm-Schritten errechnet. An die Daten der ungefütterten Larven wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse eine Gerade mit dem Vertrauensbereich (95%) angepasst..... 96

- Abb. 61: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei den Steinbuttlarven von der ersten Aufzucht 1986. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 60 vermerkt. 97
- Abb. 62: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei Steinbuttlarven von der zweiten Aufzucht 1986, die mit hoher und geringer Futterdichte aufgezogen wurden, und bei hungernden Steinbuttlarven bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 2-13 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode. 98
- Abb. 63: Trypsinaktivitäten bei Steinbuttlarven von der zweiten Aufzucht 1986, die bei hoher und geringer Futterdichte aufgezogen wurden, sowie von hungernden Steinbuttlarven (Hungerdauer 2-7 Tage) in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden in 0.5mm-Schritten errechnet. An die Daten der ungefütterten Gruppen wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse eine Gerade angepasst und mit dem Vertrauensbereich der Regression (95%) gezeigt. 99
- Abb. 64: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei den Steinbuttlarven von der zweiten Aufzucht 1986. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 63 vermerkt. 99
- Abb. 65a & b: Erste und zweite Steinbuttlarvenaufzucht 1986. Vergleich der Trypsinaktivitäten (a) und des Temperaturverlaufs (b) während der beiden Aufzuchtversuche in Beziehung zum Larvenalter. Wegen der deutlich geringeren Trypsinaktivitäten bei der zweiten Aufzucht wurden unterschiedlich skalierte y-Achsen verwendet (Abb. 65a)..... 100
- Abb. 66: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Dorschlarven bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 9-20 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode. 101
- Abb. 67: Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Dorschlarven in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden in 0.5mm-Schritten errechnet. An die Werte der Hungergruppen wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse eine Gerade angepasst und mit dem Vertrauensbereich der Regression (95%) gezeigt..... 102
- Abb. 68: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei Dorschlarven. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 67 vermerkt. 103
- Abb. 69: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Wolfsbarschlarven bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 7-13 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode in Tagen..... 104
- Abb. 70: Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Wolfsbarschlarven in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden in 0.5 mm-Schritten errechnet. An die Werte der

hungernden Larven wurde eine lineare Regression angepasst und mit dem Vertrauensbereich der Regression (95%) gezeigt.....	104
Abb. 71: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei Wolfsbarschlarven. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 70 vermerkt.	105
Abb. 72: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Goldbrassenlarven bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 8-20 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode in Tagen.....	106
Abb. 73: Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Goldbrassenlarven in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden in 0.5mm-Schritten errechnet. Die Gerade bei den ungefütterten Gruppen wurde mit Hilfe der Regressionsanalyse angepasst und wird mit dem Vertrauensbereich der Regression (95%) gezeigt.....	107
Abb. 74: Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei Goldbrassenlarven. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 73 vermerkt	108
Abb. 75: Verlauf der Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Sardinenlarven bezogen auf das Larvenalter. Die Mittelwerte repräsentieren 3-22 individuelle Messungen, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen der Mittelwerte. Die gepunkteten Linien führen zum Beginn eines Hungerintervalls, die Ziffern an den Symbolen der Hungergruppen bezeichnen die Dauer der Hungerperiode.	109
Abb. 76: Trypsinaktivitäten bei gefütterten und hungernden Sardinenlarven in Beziehung zur Larvenlänge. Die Mittelwerte wurden in 0.5 mm-Schritten errechnet. Die Gerade wurden mit Hilfe der Regressionsanalyse an die ungefütterten Larvengruppen angepasst und mit dem Vertrauensbereich der Regression (95%) gezeigt.....	110
Abb. 77. Das Längenwachstum in Beziehung zum Larvenalter bei den Larven der brasilianischen Sardine. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. 54. Die Gesamtzahl analysierter Larven ist in der Abb. 76 vermerkt.	111
Abb. 78: Tagesrhythmisches Muster der Trypsinaktivität in Beziehung zu Futter und Fütterungszeit. Die 30 (I), 37 (II) und 42 (III) Tage alten Larven wurden im Labor aufgezogen und kontinuierlich gefüttert. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Fütterung mit Rotatorien (B, <i>Brachionus plicatilis</i> , 5 ml ⁻¹) und <i>Artemia</i> -Nauplien (A, 1ml ⁻¹). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-15 individuellen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit der Standardabweichung. Die gestrichelte Linie entspricht der jeweiligen mittleren Trypsinaktivität bei hungernden Larven entsprechenden Alters.	113
Abb. 79: Tagesrhythmisches Muster der Trypsinaktivität nach 4 Tagen Futterentzug und Wiederanfütterung bei 37 Tage alten Heringslarven. Die Larven wurden im Labor zunächst bei hoher Futterdichte aufgezogen und vor Beginn dieses Versuchs 4 Tage lang unter Futterentzug gehalten. Nach einer ersten Probennahme wurden die Larven wieder gefüttert. Die Pfeile	

- verweisen auf den Zeitpunkt der Fütterung mit Rotatorien (B, *Brachionus plicatilis*, 5 ml⁻¹) und Artemia-Nauplien (A, *Artemia spec.*, 1 ml⁻¹). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-15 individuellen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit der Standardabweichung. Die gestrichelte Linie entspricht der mittleren Trypsinaktivität bei hungernden Larven entsprechenden Alters. 114
- Abb. 80: Tageszeitliches Verhalten der Trypsinaktivität in Beziehung zur Futterzeit und Fütterungsfrequenz. Die 12 Tage alten Steinbuttlarven waren vor diesem Versuch kontinuierlich gefüttert worden. Die Pfeile verweisen auf den jeweiligen Zeitpunkt der Fütterung mit angereicherten Rotatorien (B, *Brachionus plicatilis*, Futterdichte 5-10 ml⁻¹). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-15 individuellen Messungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den Standardabweichungen. Die gestrichelte Linie entspricht der mittleren Trypsinaktivität bei 10 Tage alten, hungernden Steinbuttlarven..... 115
- Abb. 81: Tageszeitliches Muster der Trypsinaktivität bei 19 Tage alten Steinbuttlarven nach 2 Tagen Futterentzug und Wiederaanfütterung. Die Larven waren im Labor zunächst bei hoher Futterdichte aufgezogen worden. Vor der Probennahme wurden die Larven 2 Tage lang unter Futterentzug gehalten und nach der ersten Probennahme wieder gefüttert. Der Pfeil verweist auf den Zeitpunkt der Fütterung mit Artemia-Nauplien (A, 1 ml⁻¹). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-15 individuellen Messungen mit den Standardabweichungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die gestrichelte Linie entspricht der mittleren Trypsinaktivität bei hungernden Steinbuttlarven entsprechenden Alters. 116
- Abb. 82: Tageszeitliches Muster der Trypsinaktivität bei 26 Tage alten Steinbuttlarven nach 3 Tagen Futterentzug und Wiederaanfütterung. Die Larven waren im Labor zunächst bei hoher Futterdichte aufgezogen worden. Vor der Probennahme wurden die Larven 3 Tage unter Futterentzug gehalten und nach der ersten Probennahme wieder gefüttert. Der Pfeil verweist auf den Zeitpunkt der Fütterung mit Artemia-Nauplien (A, 1 ml⁻¹). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-15 individuellen Messungen mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die gestrichelte Linie entspricht der mittleren Trypsinaktivität hungernder Larven entsprechenden Alters..... 117
- Abb. 83: Tageszeitlicher Rhythmus der Trypsinaktivitäten bei 16 Tage alten Dorschlarven unter dem Einfluss von 3 verschiedenen Futterdichten (*Brachionus plicatilis*, hohe Futterdichte 4 ml⁻¹, geringe Futterdichte 0.4 ml⁻¹ und eine Hungergruppe). Der Pfeil verweist auf den Zeitpunkt der Fütterung mit Rotatorien. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 7-10 (hohe Futterdichte), 5-10 (geringe Futterdichte) und 2-10 (Hungergruppe) individuellen Messungen. Auf eine Darstellung der Standardabweichungen wurde zur Erhaltung der Übersicht verzichtet. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den Standardabweichungen. Die gestrichelte Linie entspricht der mittleren Trypsinaktivität hungernder Dorschlarven entsprechenden Alters aus den Kalibrierungsexperimenten. 118

- Abb. 84 a & b: Abschätzung des Anteils hungernder Heringslarven in Feldproben aus dem Englischen Kanal (Stat AD 98) im Januar sowie aus dem Orkney-Shetland und Hebriden-Gebiet im September (Stat. POS 703 & 510). Die Symbole repräsentieren individuelle Messwerte von Heringslarven aus den jeweiligen Feldproben. Die Regressionsgerade mit dem 95%-Vorhersagebereich der Regression wurde aus den Werten für 4-9 Tage hungernde Heringslarven im Laborversuch berechnet und dient als Kriterium für die Beurteilung des Ernährungszustandes der Feldlarven. Auf dieser Basis wurden in der Probe von Stat. AD 98 27.9% der Heringslarven als hungernd klassifiziert, in der Probe von Stat. POS 703 keine und von der Stat. POS 510 80.2% der Heringslarven als hungernd klassifiziert. Zur besseren Auflösung des kritischen Bereichs wurde die Skalierung der Ordinate geteilt. 120
- Abb. 85: Abschätzung des Anteils hungernder Heringslarven in einer Feldprobe nördlich von Schottland im September, Stat. POS 511, und einer Probe aus dem Nord-Ostsee-Kanal im Mai. Die Symbole repräsentieren individuelle Messwerte von Heringslarven aus den Feldproben. Die Regressionsgerade mit dem 95%-Vorhersagebereich der Regression wurde aus den Werten für 4-9 Tage hungernde Heringslarven im Laborversuch berechnet und dient als Kriterium für die Beurteilung des Ernährungszustandes der Feldlarven. Auf dieser Basis wurden in der Probe von Stat. POS 511 36.6% und in der Probe aus dem Nord-Ostsee-Kanal 21.6% der Heringslarven als hungernd klassifiziert. Zur besseren Auflösung des kritischen Bereichs wurde die Skalierung der Ordinate geteilt. 121
- Abb. 86a & b: Laborversuche mit Heringslarven aus der Schlei. Die Heringslarven wurden im Abstand von einer Woche in der Schlei gefangen. Der erste Messwert zeigt die Trypsinaktivität der direkt aus dem Feld entnommenen Probe (Tag 0). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von individuellen Messungen an 3-10 Larven und werden mit den Standardabweichungen für die Mittelwerte gezeigt. Die gestrichelte Linie zeigt den Grenzwert für 26 mm grosse, hungernde Heringslarven aus der Laboraufzucht. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die mittlere Länge aller Larven im ersten Experiment ist 24.15 mm, im zweiten Experiment 24.74 mm. 123
- Abb. 87: Trypsinaktivität bei Heringslarven aus der Schlei, die im Labor erst 7 Tage mit Artemia-Nauplien gefüttert wurden (Futterdichte 1 ml^{-1}) und dann 3 Tage unter Futterentzug gehalten wurden. Die erste Probe repräsentiert die Trypsinaktivität der direkt aus der Schlei entnommenen Feldprobe (Tag 0). Die Datenpunkte sind Mittelwerte von individuellen Messungen an 5-11 Larven und werden mit den Standardabweichungen um den Mittelwert gezeigt. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Grenzwert für 26 mm grosse Heringslarven aus der Laboraufzucht. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den jeweiligen Standardabweichungen. Die mittlere Länge aller Larven betrug 26.1 mm. 124
- Abb. 88: Abschätzung des Anteils hungernder Dorschlarven in einer Feldprobe aus dem Bornholmbecken. Die Symbole repräsentieren individuelle Messwerte. Die Regressionsgerade mit dem 95%-Vorhersagebereich der Regression wurde aus den Werten für 2-8 Tage hungernde Dorschlarven im Laborversuch berechnet und dient als Kriterium für die Beurteilung des Ernährungszustandes der Feldlarven. Auf dieser Basis wurden in der Probe 30.8% der Dorschlarven als hungernd klassifiziert. 125

- Abb. 89: Abschätzung der Anzahl hungernder Sprottenlarven in einer Feldstudie in der Nordsee von Mai bis August 1991. Jedes Symbol repräsentiert die Trypsinaktivität einer Sprottenlarve. Als Beurteilungskriterium für die Berechnung der Anzahl hungernder Sprottenlarven wurde die Laborkalibrierung von Heringslarven angewendet. Als Grenzwert gilt die obere Schranke des 95%-Vorhersagebereiches der Regressionsgeraden, die an die Trypsinaktivitäten von 4-9 Tage hungernden Heringslarven angepasst wurde. Zur besseren Auflösung des kritischen Bereichs wurde die Skalierung der Ordinate geteilt..... 126
- Abb. 90: Vergleich des relativen Anteils hungernder Sprottenlarven (linke Hälfte der Grafik) an der Anzahl biochemisch analysierter Individuen zu unterschiedlichen Probennahmeterminen während der gesamten Laichsaison der Sprotte in der Deutschen Bucht. Der Zeitpunkt der Probennahme ist an der Ordinate angegeben. Zusätzlich sind die Verhältnisse bei der Driftstation dargestellt. Die Angabe von Ind. ml⁻¹ bezieht sich auf die Zooplanktondichte. Bei der Angabe der Juvenilendichte bedeutet das Symbol O, dass keine juvenilen Sprotten im Herbst gefangen wurden, + bedeutet eine geringe Dichte, +++ bedeutet eine relativ hohe Dichte juveniler Sprotten in den Herbstfängen. 128
- Abb. 91: Abschätzung der Anzahl hungernder Sardinenlarven in einer Feldprobe auf der Basis der Laborkalibrierung. Jedes Dreiecksymbol repräsentiert die Trypsinaktivität einer Sardinenlarve. Als Beurteilungskriterium für die Berechnung der Anzahl hungernder Sardinenlarven wurde die Laborkalibrierung für diese Art angewendet. Als Grenzwert gilt die obere Schranke des 95%-Vertrauensbereich der Regressionsgeraden, die an die Trypsinaktivitäten von 1-2 Tage hungernden Sardinenlarven angepasst wurde. Hierbei wurden 28.6% der Larven aus der Feldprobe als hungernd eingestuft. 130
- Abb. 92: Abschätzung des Anteils hungernder Schellfischlarven in einer Feldprobe unter Berücksichtigung der Laborkalibrierungen für Wolfsbarschlarven. Jedes Kreuzsymbol steht für die Trypsinaktivität einer Schellfischlarve. Die Punkte repräsentieren die Mittelwerte für gefütterte Wolfsbarschlarven aus der Laboraufzucht. Die Ellipsen markieren den Bereich, in dem 95% der individuellen Messwerte für gefütterte Wolfsbarschlarven respektive für Schellfischlarven (gestrichelt) zu finden sind. Die Regressionsgerade mit dem 95%-Vorhersagebereich der Regression für 2-7 Tage hungernde Wolfsbarschlarven dient als Kriterium für die Beurteilung des Ernährungszustandes der Schellfischlarven..... 131
- Abb. 93: Tageszeitlicher Rhythmus der Trypsinaktivitäten bei Sprottenlarven von einer Driftstation in der Deutschen Bucht über einen Zeitraum von 24 Stunden. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-15 individuellen Messungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den Standardabweichungen. 132
- Abb. 94: Tageszeitlicher Rhythmus der Trypsinaktivitäten bei Sprottenlarven von einer Driftstation in der Deutschen Bucht über den Zeitraum von 36 Stunden. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 10-18 individuellen Messungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der analysierten Larven mit den Standardabweichungen. 133
- Abb. 95: Tagesperiodischer Rhythmus der Trypsinaktivitäten bei Sardinenlarven von einer Driftstation vor der spanischen Nordwestküste über den Zeitraum von 48 Stunden. Die Datenpunkte sind Mittelwerte von 8-20 individuellen Messungen. Die Balken repräsentieren die mittlere Länge der

- analysierten Larven mit den Standardabweichungen. Der relative Anteil von Sardinenlarven mit gefüllter Schwimmblase ist bei den entsprechenden Proben vermerkt. 134
- Abb. 96: Vergleich der Zunahme der Trypsinaktivität mit der Larvengröße bei gefütterten Larven aller in dieser Arbeit im Labor kalibrierten Arten. Die bei diesem Vergleich berücksichtigte Lebensspanne (Larvenalter) ist bei der jeweiligen Art angegeben. Die bei der Aufzucht tatsächlich erreichte Larvenlänge ist bei einigen Arten geringer als die maximale Skalierung angibt. Die oberhalb der maximal erreichten Länge liegenden Werte auf den Regressionsgeraden sind daher für den Vergleich extrapoliert. Altersabhängige Schwankungen der Trypsinaktivität wurden für diesen Vergleich nicht berücksichtigt 147
- Abb. 97: Vergleich der nach mehreren Tagen Futterentzug verbliebenen Trypsinaktivität in Abhängigkeit von der Larvenlänge für alle im Labor aufgezogenen Arten. Die bei diesem Vergleich berücksichtigte Lebensspanne (Larvenalter) ist bei der jeweiligen Art angegeben. Die bei der Aufzucht tatsächlich erreichte Larvenlänge ist bei einigen Arten geringer als die maximale Skalierung angibt. Die oberhalb der maximal erreichten Länge liegenden Werte auf den Regressionsgeraden sind daher extrapoliert. 148
- Abb. 98: Schematische Darstellung der Phasentheorie am Beispiel der sehr ausgeprägten Entwicklung der Trypsinaktivität bei Steinbuttlarven. Phase I (die schraffierte Fläche wird darüber als vergrößernder Ausschnitt gezeigt) steht für die Dottersackphase und den Beginn der exogenen Nahrungsaufnahme. Phase II kann wegen einer Reduktion der Verdauungsenzymkapazität als eine kritische Phase bezeichnet werden. Diese Phase ist oft verbunden mit einer Wachstumsdepression und hohen Mortalitätsraten. In Phase III sind Trypsinbedarf und Produktion ausbalanciert, diese Phase ist bei optimaler Futterversorgung durch hohe Zuwachsraten gekennzeichnet. In Phase IV beginnt die Metamorphose und ein Teil der Trypsinaktivität wird bereits durch die Aktivität von Pepsin im Magen ersetzt. 151

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Enzymkinetische Parameter für Trypsin aus Herings- und Steinbuttlarven und für ein Standardtrypsin aus Rinderpankreas. Je geringer der K_m -Wert (halbmaximale Substratsättigung) ist, desto höher ist die Substrataffinität. Je höher der Quotient aus K_{cat} / K_m (katalytische Effizienz) ist, desto spezifischer ist ein Substrat für ein bestimmtes Enzym und um so effizienter erfolgt der Substratumsatz. Die Daten gelten für die Standardversuchsbedingungen (30°C, pH-Wert 8.00). 74
- Tab. 2: Die Matrix gibt einen Überblick über die Ergebnisse zum Test auf signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den errechneten Faktoren der 6 kalibrierten Arten. ✓ steht für einen signifikanten Unterschied, bedeutet einen nicht signifikanten Unterschied der Mittelwerte. In der letzten Zeile sind die Faktoren für jede Art notiert. 81
- Tab. 3: Vergleich des relativen Anteils hungernder Fischlarven in Feldproben verschiedener Arten basierend auf der Berechnung mittels eines Faktors und der Berechnung unter direkter Anwendung der jeweiligen Laborkalibrierung. Die Pfeile deuten die Abweichung der Faktorberechnung nach unten oder oben vom direkt berechneten Wert an. In der rechten Spalte ist die Anzahl individuell analysierter Larven aus der jeweiligen Feldprobe angegeben (n)..... 82

- Tab. 4: Vergleich der enzymkinetischen Parameter für das Trypsin aus Herings- und Steinbuttlarven sowie ein Standardtrypsin aus Rinderpankreas für jeweils zwei Substrate. Je geringer der K_m -Wert (halbmaximale Substratsättigung) ist, desto höher ist die Substrataffinität zum jeweiligen Enzym. Je höher der Quotient aus K_{cat}/K_m (katalytische Effizienz) ist, desto effizienter spaltet das Enzym ein bestimmtes Substrat. Alle Messungen wurden unter Standardbedingungen durchgeführt (30°C, pH-8.00)..... 85
- Tab. 5: In der Tabelle sind wichtige zusätzliche Parameter zur Bewertung der Konditionsmessungen bei den Sprottenlarven (siehe Abb. 89) zusammengefasst. Alle Angaben beziehen sich ausschliesslich auf die biochemisch analysierten Sprottenlarven. Bei der Angabe der Juvenilendichte bedeutet 0 es wurden keine juvenilen Sprotten im Herbst gefangen, + bedeutet eine geringe Dichte, +++ bedeutet eine hohe Juvenilendichte..... 127
- Tab. 6: Beispiele für verschiedene Felduntersuchungen bei denen mit unterschiedlichen Methoden der Ernährungszustand von Fischlarven abgeschätzt wurde (n.v. = nicht veröffentlicht). 143

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. W. Nellen danke ich für die Anregung zur Promotion, für die Unterstützung meiner Forschungstätigkeit, für die hilfreiche Durchsicht des Manuskriptes und das Vertrauen und die beständige Geduld auf die Fertigstellung dieser Arbeit zu warten.

Herrn Prof. D. Schnack danke ich für die grosszügige Unterstützung und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes mit denen für die Durchführung der Arbeiten erforderlichen Gerätschaften am Institut für Meereskunde.

Meiner Kollegin Catriona Clemmesen danke ich für die zuverlässige Zusammenarbeit bei der gemeinsamen Aufzucht von Fischlarven, für stete Diskussionsbereitschaft und für die aufmunternden Worte in kritischen Phasen während der Fertigstellung der Arbeit.

Den Mitarbeitern der Abteilung Fischereibiologie danke ich für die stete Hilfsbereitschaft bei der Lösung kleinerer und grösserer Probleme während der Durchführung der praktischen Arbeiten zu dieser Dissertation.

Bei der Beschaffung von Feldproben waren die Forschungsschiffe Sagitta, Poseidon, Meteor Victor Hensen und Veliger beteiligt, ich bedanke mich für die Bereitstellung von Schiffszeiten und für die Hilfsbereitschaft der Schiffsbesatzungen.

Dem Instituto Oceanografico, Universität Sao Paulo, dem Aquakulturbetrieb BUTT in Kiel-Bülk und Marc Nolting danke ich für die unschätzbare Hilfe bei der Durchführung von Fischlarvenaufzuchten zu Kalibrierungszwecken.

Meiner Lebensgefährtin Alexandra danke ich ganz herzlich für die Schaffung einer geeigneten privaten Atmosphäre, die mir erst die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht hat und die unentbehrliche Hilfe bei der Verbesserung der verschiedenen Versionen.

Ohne die finanzielle Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG Ne 99/19-1+2) sowie des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF MFE 0941/9) und einiger anderer Institutionen hätte diese Studie in der vorliegenden Form nicht durchgeführt werden können.

Diese Dissertation hat lange Zeit meine beruflichen Tätigkeiten begleitet. In diesem Umfeld habe ich mit zahlreichen Kolleginnen und Kollegen viele hilfreiche Diskussionen und Gespräche über das Thema dieser Arbeit geführt. Es ist mir nicht möglich hier jede und jeden persönlich zu benennen, aber allen sei mein Dank für ihren persönlichen Beitrag zu dieser Arbeit versichert.